T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖPEKLERDE CANINE DISTEMPER VIRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ela ESİN

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sibel YAVRU

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖPEKLERDE CANINE DISTEMPER VIRUS ENFEKSİYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Ela ESİN

DOKTORA TEZİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sibel YAVRU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102062 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını maddi yönden destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Bu çalışmanın başlangıcından itibaren her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr.Feridun ÖZTÜRK, Prof.Dr.Atilla ŞİMŞEK, Doç.Dr.Orhan YAPICI, Doç.Dr.Oya BULUT ve Araş.Gör.Dr.Oğuzhan AVCI'ya teşekkür ederim.

Tez örneklemelerimde yardımlarını esirgemeyen meslektaşım ve hayat arkadaşım Dr.Evren ESİN'e teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde hem maddi hem de manevi emek ve katkılarından dolayı anneme, babama ve kız kardeşime ayrı ayrı teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Aminoasit
Ab	Antibody (Antikor)
Ag	Antigen (Antijen)
bp	Base Pair (Baz Çifti)
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
°C	Derece Santigrat
CAV	Canine Adenovirus
CD	Canine Distemper
CDV	Canine Distemper Virus
CPE	Cytopathogenic Effect (Sitopatik etki)
CPV	Canine Parvovirus
CRV	Canine Rotavirus
CsCl	Sezyum Klorür
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Füzyon Protein
FDS	Fötal Dana Serumu
H	Hemaglutinin Proteini
IF	Immunfloresan
i.n.	İntranükleer
i.s.	İntrastoplazmik
KKS	Keratonjuktivitis Sicca
kDa	Kilodalton
L	Large Proteini
M	Matriks Protein
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ml	Mililitre
MV	Measles Virus (Kızamık Virus)

µl	Mikrolitre
N	Nükleokapsit Proteini
nm	Nanometre
NK	Negatif Kontrol
P	Fosfoprotein
PBS-M	Phosphate Buffered Saline- Minus
pH	Power of Hydrogen
PPRV	Peste Des Petits Ruminant Virus(Küçük Ruminant Vebası Virusu)
PK	Pozitif Kontrol
rpm	Revolutions per minute (devir/dk)
RNA	Ribonükleik asit
RPV	Rinder Pest Virusu (Sığır Vebası)
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
OD	Optik Dansite
Th	Helper (Yardımcı) T lenfosit
Tc	Cytotoxic (Baskılayıcı) T lenfosit
VERO	African Green Monkey Kidney (Afrika Yeşil Maymun Böbreği)
VNT	Virus Nötralizasyon Testi
%	Yüzde

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR i

1. GİRİŞ 1-28

1.1. Genel Bilgiler 1

1.2. Etiyoloji 2

1.2.1. Sınıflandırma 2

1.2.2. Morfoloji 6

1.2.3. Kimyasal Durum 6

1.2.4. Viral Proteinler 7

1.2.4.1. Yapısal Proteinler 8

1.2.4.1.1. N Proteini 8

1.2.4.1.2. P proteini 8

1.2.4.1.3. M Proteini 8

1.2.4.1.4. F Proteini 9

1.2.4.1.5. H Proteini 10

1.2.4.1.6. L Proteini 10

1.2.4.2. Yapısal Olmayan Proteinler 11

1.2.5. Virus'un Üretildiği İnvivo ve İnvitro Sistemler 12

1.3. Epidemiyoloji 13

1.3.1. Konakçı Duyarlılığı 13

1.3.2. Bulaşma 14

1.4. Patogenez 15

1.5. Patoloji 16

1.5.1. Makroskobik Bulgular 16

1.5.2. Mikroskobik Bulgular 17

1.6. Klinik Bulgular 20

1.6.1. Sistemik Bulgular 20

1.6.2. Nörolojik Bulgular 21

1.6.3. Diğer Bulgular 21

1.7. İmmunoloji 22

1.8. Teşhis 23

1.8.1. Klinik Teşhis 23
1.8.2. Hematolojik Teşhis 23
1.8.3. Serolojik Teşhis 24
1.8.4.Virolojik Teşhis 25
1.9. Korunma ve Kontrol 26
1.10. Tedavi 28
2. GEREÇ VE YÖNTEM 29-37
2.1. Gereç 29
2.1.1. Araştırmada Örneklenen Hayvanlar 29
2.1.2. Hücre Kültürü 32
2.1.3. Fötal Dana Serumu 32
2.1.4. Serolojik Kontrol Materyali 32
2.1.5. Virolojik Kontrol Materyali 32
2.2. Yöntem 33
2.2.1. Serolojik Çalışmalar 33
2.2.1.1. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması 33
2.2.1.2. İndirekt ELISA 33
2.2.1.3. İndirek ELISA Testinin Uygulanması 34
2.2.1.4. Testin Değerlendirilmesi 35
2.2.1.5. Testin Geçerliliği 35
2.2.1.6. Sonuçların Değerlendirilmesi 35
2.2.2. Virolojik Kontroller 35
2.2.2.1. VERO Devamlı Hücre Kültürü Hazırlanması 35
2.2.2.2. Kan Lökosit Örneklerinin Hazırlanması 36
2.2.2.3. VERO Hücre Kültürüne Lökosit Örneklerinin Ekimi 36
2.2.2.4. Rapit Testte Kullanılacak Kan Serum Örneklerin Hazırlanması 36
2.2.2.5. Rapit Test 36
2.2.2.6. Testin Uygulanması 37
2.2.2.7. Testin Değerlendirilmesi 37
2.2.2.8. İstatistiki Analiz 37
3. BULGULAR 38-47
3.1. Serolojik Çalışma Sonuçları 38
3.1.1. İndirekt ELISA Sonuçları 38

3.2. Virolojik Çalışma Sonuçları 39
3.2.1. Hücre Kültürü İnokülasyonu sonuçları 39
3.2.2. Rapid Test sonuçları 41
3.3. İstatistiki Sonuçlar 42
3.3.1. Testler Arası Sensitivite ve Spesifite Değerlerinin Hesaplanması 42
3.3.2. Testlerin İstatistiksel Analizleri 43
4.TARTIŞMA 48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 53
6. ÖZET 54
7. SUMMARY 55
8. KAYNAKLAR 56
9. EKLER 65
10. ÖZGEÇMİŞ 66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Morbillivirus'un elektron mikroskobik görüntüsü…… 3

Şekil 1.2. CDV proteinlerinin şematik görünümü……. 7

Şekil 1.3. Morbillivirus'ların genom yapısı…….. 11

Şekil 1.4. CDV ve diğer Morbillivirus'ların filogenetik ilişkisi…… 12

Şekil 1.5. Dolicocephalic köpek türleri ……. 14

Şekil 1.6. Brachycephalic köpek türleri ……... 14

Şekil 1.7. İmmunokromatografik yöntem …… 26

Şekil 2.1. Mukopurulent karakterdeki burun akıntısı görünümü (15 numaralı örnek) 29

Şekil 2.2. Mukopurulent karakterdeki göz akıntısı ve göz çevresinde hiperkeratozis (50 numaralı örnek). 30

Şekil 2.3. CDV enfeksiyonlu köpekte megaözafagusun radyolojik görünümü (77 numaralı örnek) 31

Şekil 2.4. CDV enfeksiyonlu kaşektik köpek görüntüsü (55 numaralı örnek)……. 31

Şekil 2.5. CDV enfeksiyonlu kaşektik köpek görüntüsü (66 numaralı örnek)……. 31

Şekil 3.1. Serum örnekleri için İndirekt ELISA ……. 38

Şekil 3.2. VERO Devamlı Hücre Kültürü (Hücre Kontrol)..…….. 40

Şekil 3.3. VERO Hücre Kültürlerine ekimi yapılan lökosit örneklerinin hücrelerde 7 gün sonra meydana getirdiği CPE'ler 40

Şekil 3.4. Rapid Test negatif ve pozitif örnekler…….. 41

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1. Morbillivirusların etkilediği türler…… 5
Çizelge 2.1. Örneklenen hayvanların sağlandıkları yerlere göre dağılımı…… 33
Çizelge 3.1. Örneklerin toplandığı yerler ve İndirek ELISA sonuçları……. 39
Çizelge 3.2. Örneklerin toplandığı yerlere göre ve CDV Rapid Test sonuçlar…. 41
Çizelge 3.3. Rapid test ve virus izolasyon testlerinin spesifitesi sensivitesi……. 42
Çizelge 3.4. ELISA ve rapid testlerinin spesifitesi sensivitesi……. 42
Çizelge 3.5. ELISA ve virus izolasyon testlerinin spesifitesi sensivitesi…… 42
Çizelge 3.6. Araştırmanın serolojik ve virolojik toplu sonuçları…….. 44

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Canine Distemper (CD), "Köpek Gençlik Hastalığı" olarak da bilinen, sindirim, solunum ve Merkezi Sinir Sistemi'ni (MSS) etkileyen, başta köpekler olmak üzere tilki ve dağ gelinciği gibi diğer karnivorlar ile deniz memelilerinde de görülebilen öldürücü viral bir enfeksiyondur (Beineke ve ark 2009).

Dünya çapında enzootik yayılım gösteren Canine Distemper Vırus (CDV) enfeksiyonu uzun bir geçmişe sahiptir. Yaklaşık 250 yıl önce enfeksiyonun köpeklerde ve diğer karnivorlarda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Rikula 2008). CDV'nin ilk olarak 1746 yılında Güney Amerika'da, 1760'ta İspanya'da ve İngiltere'de, 1764'de İtalya'da, 1770'de ise Rusya'da görüldüğü rapor edilmiştir (Blancou 2004). İlk kez Edwar Jenner tarafından 1809 yılında CDV'nin klinik belirtileri bildirilmiştir. CDV enfeksiyonuna neden olan etkenin bir virus olduğu ilk olarak 1906 yılında Carre tarafından rapor edilmiştir (Murphy ve ark 1999, Maclachlan ve Dubovi 2011).

Canine Distemper Virus enfeksiyonunun köpekler arasında bulaşma oranı açıklanırken insanlar arasında görülen çiçek ve kızamık enfeksiyonları kadar bulaşıcı karakter taşıdığı vurgulanmıştır (Rikula 2008).

Canine Distemper Virus enfeksiyonunun morbidite ve mortalite oranı aşılanmamış hayvanlarda oldukça yüksektir (Blixenkrone-Moller ve ark 1991, Murphy ve ark 1999, Shin ve ark 2004, Pomeroy ve ark 2008). Köpeklerde görülen viral enfeksiyonların mortalite oranları göz önüne alındığında, CDV enfeksiyonunun kuduzdan sonra ikinci sırayı aldığı bildirilmiştir (Deem ve ark 2000).

Tüm dünyada sosyoekonomik gelişmeleri takiben evlerde beslenen pet hayvan sayılarında artışlar görülmüştür. Sahiplenilen hayvanlar ya hayvan sahiplerinden ya da pet hayvanı yetiştirip satanlardan alınmaktadır. Bu şekilde edinilen yavrular çoğu zaman sütten kesilme yaşına dikkat edilmeden annelerinin yanından alınmakta ve bu durum yavrunun yeteri kadar kolostrum alamamasına

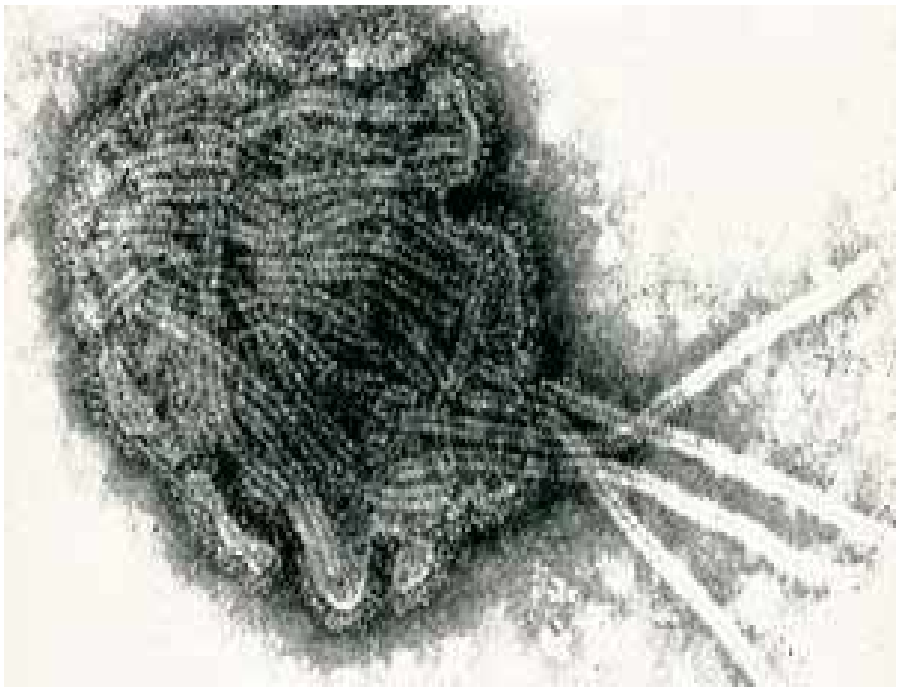
neden olmaktadır. Erken sütten kesilme neticesinde yeteri kadar kolostrum alamayan yavruların maternal antikor miktarları normalin (koruyucu düzenin) çok altında kalmaktadır. Yetersiz maternal antikor alan yavru köpeklerde CDV, Canine Parvovirus (CPV), Canine Rotavirus (CRV) ve Canine Adenovirus (CAV) gibi morbidite ve mortalitesi yüksek olan viral etkenlerin yol açtığı enfeksiyonlar sıklıkla görülmektedir. Viral etkenlerin bulaşma yolları göz önüne alındığında ise hayvan barınaklarının bakım-besleme koşullarının yanında ayrıca koruyucu hekimlik önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi, Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı ve Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi'nde bulunan, ayrıca Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi ve Konya ve çevresinde bulunan serbest pet kliniklerine getirilen 0-12 aylık, CDV yönünden aşı uygulaması yapılmamış, çeşitli klinik bulgulara (göz ve burun akıntısı, titreme, hırıltılı solunum) sahip köpeklerde CDV enfeksiyonunun varlığının araştırılması amaçlandı.

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Canine Distemper Virusu (Şekil 1.1.), Mononegavirales takımı içerisinde bulunan *Paramyxoviridae* ailesinin *Morbillivirus* genusu içerisinde yer almaktadır (Blixenkrone-Moller ve ark 1991, Stern ve ark 1995, Bolt ve ark 1997, Mayo ve Pringle 1997, Apell ve Summers 1999, Von Messling ve Cattaneo 2002, Banyard ve ark 2006, Elia ve ark 2006, Calderon ve ark 2007, Martella ve ark 2007, Maclachlan ve Dubovi 2011, Carvalho ve ark 2012, Guo ve ark 2013, Terio ve Craft 2013).



Şekil 1.1. Morbillivirus'un elektron mikroskobik görüntüsü (Di Sciara 2002).

Morbillivirus genusuna ait viruslar, 1988 yılına kadar köpeklerde ve vahşi karnivorlarda CDV'u, insanlarda Measles (Kızamık) Virus (MV)'u, küçük ruminantlarda Peste Des Petits Ruminants Virus (PPRV)'u ve büyük ruminantlarda Rinderpest Virus (RPV)'u olarak gruplandırılmıştır. Fakat daha sonra ortaya çıkan ve karakterizasyonu yapılan fokgillerde görülen Phocid Distemper Virus ve deniz memelilerinde görülen Cetacean Morbillivirus da Morbillivirus genusuna dahil edilmiştir (Kennedy 1998, Di Guardo ve ark 2005, Gençay 2012).

Canine Distemper Virus, aynı genus içerisinde yer alan MV, RPV, PPR, Cetacean Morbillivirus ve Phocid Distemper Virus'u ile yakın antijenik ilişki içerisindedir (Sheshberadaran ve ark 1986, Williams 2001, Martella ve ark 2006).

Mononegavirales takımında dört aile bulunmaktadır.

1) *Paramyxoviridae*

2) *Filoviridae*

3) *Bornaoviridae*

4) *Rhabdoviridae*

Paramyxoviridae ailesinde iki genus yer almaktadır.

1) Paramyxovirinae

- Aquaparamyxovirus
- Avulavirus
- Ferlavirus
- Henipavirus
- **Morbillivirus**
  - **Canine Distemper Virus**
  - Cetacean Morbillivirus
  - Measles Virus
  - Peste Des Petits Ruminants Virus
  - Phocine Distemper Virus
  - Rinderpest Virus
- Respirovirus
- Rubulavirus

2) ***Pneumovirinae*** (ICTV dB 2013)

Morbilliviruslar, hayvan ve insan populasyonlarında yaygın olarak görülen, ekonomik kayıplara neden olabilen önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Campbell ve ark 1980, Gençay 2012). İnsanlarda ve hayvanlarda görülen morbillivirus enfeksiyonları; CDV, MV, PPRV, Cetacean Morbillivirus, Phocine (seal) Distemper Virus ve RPV enfeksiyonlarıdır (Blixenkrone-Moller ve ark 1994, Kennedy 1998). Morbillivirusların oluşturduğu enfeksiyonlar Çizelge 1.1. ’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Morbillivirusların etkilediği türler.

Morbillivirus	**Etkilenen Türler**
CDV	Carnivorlar
MV	İnsanlar
PPRV	Küçük ruminantlar
RPV	Büyük ruminantlar
Phocine Distemper Virus	Yüzgeç ayaklılar
Cetacean Morbillivirus	Su memelileri

Çeşitli ülkelerde yapılan serolojik ve moleküler çalışmalar, Morbillivirus enfeksiyonlarının farklı türler arasında tüm dünyada yaygın endemik bir enfeksiyona neden olduğunu ortaya koymaktadır (İmhoff 2006, Woma 2008). Deniz memelilerinde morbillivirus enfeksiyonuna ilk olarak 1988 yılında rastlandığı bildirilmiştir (Kennedy 1998, Visser ve ark 1993a, Di Guardo ve ark 2005). 1990 yıllında İspanya'nın Akdeniz sahillerinde bulunan yunus balıklarında (*stenella coeruleoalba*) görülen morbillivirus enfeksiyonunun 1991-1992 yıllarında ise Akdeniz'den, Fransa, İtalya, Yunanistan ve Türkiye sahillerine de hızlı bir şekilde yayıldığı rapor edilirken, 1992 yılından sonra kontrol altına alındığı bildirilmiştir (Visser ve ark 1993a, Di Guardo ve ark 2005). 1991-1992 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri hayvanat bahçesindeki leopar (*Panthera Pardus*), kaplan (*Panthera Tigris*), aslan (*Panthera Leo*) ve jaguarlar (*Panthera Onca*)'da da enfeksiyonun varlığı rapor edilmiştir (Carpenter ve ark 1998). Kennedy ve ark (2000) Hazal Deniz'inde 10.000'den fazla fok balığının (*Phoca Caspica*) 2000 yılında Morbillivirus enfeksiyonundan öldüğünü bildirmişlerdir.

1.2.2. Morfoloji

Canine Distemper Virusu konak hücre plazma membranından köken alan çift katlı lipid bir zar ile çevrili olduğu ve zar üzerinde bulunan ve 8-12 nanometre (nm) uzunluğunda olan yüzey antijenleri, viral partiküllere *Paramyxoviridae* ailesine ait karakteristik "kılçık" görüntüsünü kazandırdığı (Appel 1987, Barrett 1999) ve helikal simetriye sahip olan viral genomlarının 150-350 nm büyüklüğünde olduğu belirtilmiştir (Lamb ve Kolakofsky 1996, Maclachlan ve Dubovi 2011).

Negatif polariteli (3´-5´), tek zincirli, segmentsiz ve helikal simetrili Ribonükleik asit (RNA) içeren CDV'u (Zurbriggen ve ark 1995, Appel ve Summers 1999, Leizewitz ve ark 2001, Gröne ve ark 2003, Maes ve ark 2003, Vandevelde ve Zurbriggen 2005, Elia ve ark 2006, Calderon ve ark 2007, Martella ve ark 2007, Pomeroy ve ark 2008, Simon-Martinez ve ark 2008, Feliu-Pascual 2009, Carvalho ve ark 2012), replikasyonunu konakçı hücre sitoplazmasında gerçekleştirmektedir (Lamb ve Kolakofsky 1996).

Viral genom uzunluğu yaklaşık 15.690 baz çift (bp)'tir (Pardo 2006). *Paramyxoviridae* ailesinde genom uzunluğu 6'nın katları olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu duruma "Altı Kuralı" adı verilmektedir. Bu durum virus replikasyonu için tek bir nükleokapsid proteininin 6 nükleotide bağlanması zorunluluğunu ifade etmektedir (Calain ve Roux 1993).

1.2.3. Kimyasal Durum

Etken, çevre koşullarına oldukça hassastır. CDV'u, 50- 60 ºC'da 30 dakika (dk)'da inaktive olurken, 25 ºC'da 48 saat, 5 ºC'da ise 14 gün enfeksiyözitesini devam ettirebilmektedir (Rikula 2008, Feliu-Pascual 2009). Etken donma derecesinin altında stabildir. Ayrıca -65 ºC'da en az 7 yıl canlılığını sürdürebilmektedir (Turgut ve Ok 2001). Liyofilize olmuş CDV'u 3 yıl boyunca 4 ºC'da saklanabilir (Appel 1987). Oda ısısında ise 20 dk ile 3 saat arasında canlılığını koruyabilmektedir (Leisewitz ve ark 2001).

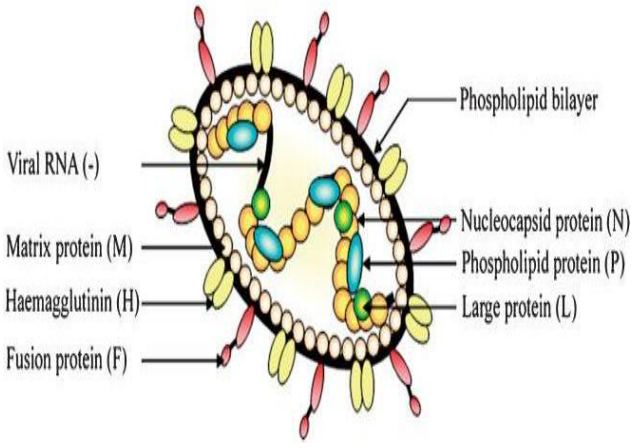
Etken, radyasyona ve ultraviyole ışınlarına maruz kaldığında kolaylıkla inaktive olmaktadır (Nema ve Cutchins 1966, Leisewitz ve ark 2001, Feliu-Pascual 2009). Aşırı asit (pH<4) ve alkali çözeltiler (pH>10) virusu inaktive ederken, virus pH 8-9 aralığında replike olmaktadır (Gillespie 1962, Rikula 2008).

Canine Distemper Virus'u lipid yapıda bir zara sahip olduğu için, lipofilik dezenfektanlara ve yağ eriticilere karşı oldukça hassastır (Appel ve Summers 1999). Etken 37 ºC'da 4 saat %0.05'lik formalin ile, 4 ºC'da 10 dk %0,75'lik fenol ile muamele edildiğinde enfeksiyözitesini kaybetmektedir (Appel 1987).

Etkenin sezyum klorürdeki (CsCl) buoyant yoğunluğu 1,30-1,31 gm/cm^3 arasındadır (Appel 1987).

1.2.4. Viral Proteinler

Viral genomda 6 tane yapısal [Nükleokapsid Protein (N), Fosfoprotein (P), Matriks Protein (M), Füzyon Protein (F), Hemaglütinin Protein (H) ve Large Protein (L)] 2 tane de yapısal olmayan protein (V ve C) bulunmaktadır (Lamb ve Kolakofsky 1996, Mcllhatton ve ark 1997, Brown ve ark 2005, Pardo ve ark 2005, Vandevelde ve Zurbriggen 2005, Elia ve ark 2006, McCarthy ve ark 2007, Rikula 2008, Maclachlan ve Dubovi 2011, Sato ve ark 2012, Guo ve ark 2013) (Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. CDV proteinlerinin şematik görünümü (Sips ve ark 2007).

Yapısal proteinler fonksiyonları ve özelliklerine göre 2 gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta bulunan viral yapı proteinleri; N, L ve P'dir. Bu proteinler viral genom ile birlikte nükleokapsidi oluştururlar ve 'Replikasyon Kompleksi' adını alırlar (Von Messling ve ark 2001, Brown ve ark 2005).

İkinci grupta bulunan viral yapı proteinleri ise; H, F ve M'dir. Bu proteinler virus'un en iyi korunmuş proteinleridir ve "Zar Proteinleri" olarak adlandırılmaktadır (Alldinger ve ark 1993, Mochizuki ve ark 1999, Seki ve ark 2003, Von Messling ve ark 2003, Brown ve ark 2005).

1.2.4.1. Yapısal Proteinler

1.2.4.1.1. N Proteini

Hem virionda hem de enfekte hücrede bulunan en önemli viral proteindir (Rima 1983, Barrett ve ark 2006, Gamiz-Mejia ve ark 2012). Viral nükleik asidi saran N proteini, viral genomun şekillenmesinde ve nükleik asidin korunmasında görev almaktadır (Lamb ve Kolakofsky 1996, Barrett 1999). N proteini viral replikasyonda ve transkrispiyonda da rol oynamaktadır (Stettler ve Zurbriggen 1995, Lamb ve Kolakofsky 1996, Barrett ve ark 2006, Lee ve ark 2010). N protein'i 523 aminoasit (aa) büyüklüğünde olup (Yoshida ve ark 1998, Barrett ve ark 2006, Gamiz-Mejia ve ark 2012) molekül ağırlığı 58 kilodalton (kDa)'dur (Woma 2008).

1.2.4.1.2. P Proteini

Fosfoprotein en büyük ikinci yapısal protein olup (Rima 1983) 507 aa büyüklüğündedir (Lamb ve Kolakofsky 1996, Barrett ve ark 2006). Fosfoprotein, N ve L proteinleri ile karşılıklı etkileşerek RNA transkripsiyonunda ve replikasyonunda rol oynamaktadır (Barrett 1999, Sato ve ark 2006, Sugai ve ark 2009). Molekül ağırlığı 73 kDa'dur (Rima 1983).

1.2.4.1.3. M Proteini

Altı yapısal protein içinde en çok bulunan proteindir (Lamb ve Kolakofsky 1996, Maclachlan ve Dubovi 2011). M proteini lipid yapıda olan zarın altında yer almakta ve viral genomu saran N proteini, H ve F proteinleri arasında köprü oluşturmaktadır (Simons ve Garoff 1980, Visser ve ark 1993b, Barrett ve ark 2006, Maclachlan ve Dubovi 2011). Matriks proteini, hidrofobik yapıda olup, virusun enfekte hücre içerisinde olgunlaşmasında ve hücreden tomurcuklanma yoluyla ayrılmasında görev almaktadır (Lamb ve Kolakofsky 1996, Barrett ve ark 2006).

335 aa büyüklüğünde (Curan ve Rima 1992) olan M proteininin moleküler ağırlığı 34 kDa'dur (Woma 2008).

1.2.4.1.4. F Proteini

Füzyon proteini virusun iyi korunmuş proteinlerinden biri olup, virusun hücre membranına tutunmasını ve daha sonra hücreye penetre olmasını sağlamaktadır. Ayrıca enfekte hücreler arasındaki zarların birleşmesini sağlayarak virus'un yayılmasında rol almaktadır (Barrett ve ark 2006).

Yüzey glikoproteini olan F ve H proteini ile birlikte konakta antiviral immunitenin oluşmasına neden olmaktadır (De Vries ve ark 1988, Simon-Martinez ve ark 2008).

Aminoasit büyüklüğü 507 olan F proteini, inaktif F_0 proteini şeklinde sentezlenmektedir (Rima 1983, Curran ve Rima 1992, Visser ve ark 1993b, Von Messling ve ark 2004, Maclachlan ve Dubovi 2011). F_0 proteini, biyolojik aktivitesini yapabilmek ve füzyon işlemini gerçekleştirmek için hücresel enzimler tarafından parçalanarak birbirine disülfid bağları ile bağlı F_1 ve F_2 proteinlerini oluşturmaktadır (Scheid ve Chopin 1977, Simons ve Garoff 1980, Rima 1983, Von Messling ve Cattaneo 2002, Barrett ve ark 2006, Lee ve ark 2010, Maclachlan ve Dubovi 2011). F_1 ve F_2 proteinlerinin yaklaşık moleküler ağırlığı sırası ile 40 – 20 kDa'dur (Woma 2008).

1.2.4.1.5. H Proteini

Hemaglutinin proteini lipid yapıdaki virusun yüzey proteinlerinden bir tanesidir (De Vries ve ark 1988). F proteini ile birlikte virusa saçaklı bir görünüm kazandırmaktadır (Barrett 1999, Barrett ve ark 2006, Maclachlan ve Dubovi 2011). H proteini, CDV'unun hücresel reseptörlere tutunmasını, F proteini ile birlikte virusun hücreye girmesini ve hücreden ayrılmasını sağlamaktadır (De Vries ve ark 1988, Barrett ve ark 2006, Beineke ve ark 2009, Bossart ve Broder 2009). İlk önce H proteini hedef hücrenin sialik asit reseptörlerine tutunur, daha sonra F proteini, virus zarı ile hücre zarının birleşmesini sağlar. Böylece H proteini hücre resöptörlerine bağlanarak enfeksiyöziteyi başlatmaktadır (Barrett ve ark 2006, Martella ve ark 2006).

Morbillivirus genusunda yer alan virusların (CDV dahil) nöroaminidaz aktivitesi bulunmamaktadır. Bu genusda yer alan viruslar sadece hemaglutinin aktivitesine sahiptirler (De Vries ve ark 1988, Lamb ve Kolakofsky 1996).

Canine Distemper Virus'a ait hemaglutinin proteini antijenik farklılıkların en fazla olduğu gen bölgesidir (Bolt ve ark 1997, Iwatsuki ve ark 2000, Rzezutka ve ark 2003, Martella ve ark 2007). Buna göre CDV yedi genetik bölgeye ayrılır. Bunlar; "*America-1, America-2, Asia-1, Asia-2, Europe, Europe wildlife, Artic*" olarak adlandırılmıştır (Martella ve ark 2007, Woma 2008, Guo ve ark 2013).

Virus'a ait proteinler içinde en az korunmuş olan H proteini, 607 aa büyüklüğünde ve 76 kDa ağırlığındadır (Lan ve ark 2005a, Woma 2008).

1.2.4.1.6. L Proteini

Large proteini Morbillivirus'ların en büyük yapısal proteinidir (Rima 1983, Mcllhatton ve ark 1997, Brown ve ark 2005, Barrett ve ark 2006). Virusu oluşturan proteinler içinde en son transkribe edilen proteindir ve ayrıca N ve P proteinlerle birlikte genomik RNA'yı oluşturmaktadır (Lamb ve Kolakofsky 1996, Woma 2008).

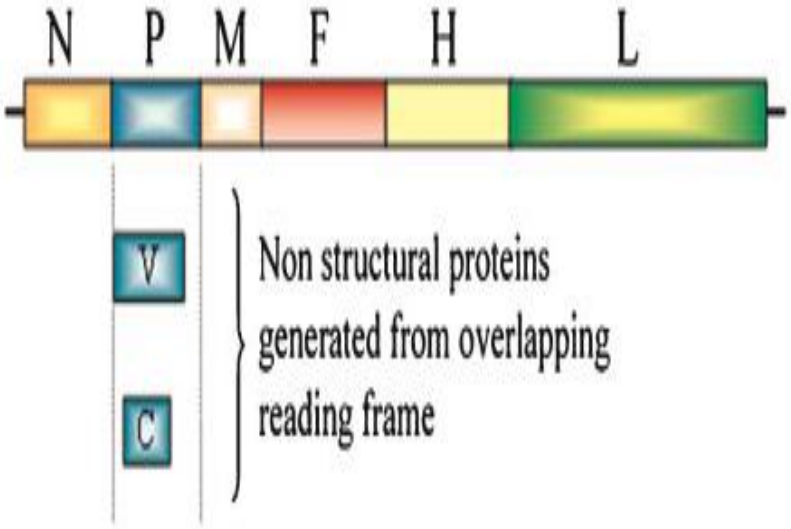
Morbillivirusların L proteini, üç tane iyi korunmuş bölge içermektedir. Birinci bölge RNA'ya bağlanmada, ikinci bölge replikasyon ve transkripsiyon aktivitelerinde, üçüncü bölge ise diğer nükleotidlere bağlanmada rol oynamaktadır (Mcllhatton ve ark 1997).

Large Proteini 2200 aa büyüklüğünde ve 160 kDa - 200 kDa arasında değişebilen moleküler ağırlığına sahiptir (Rima 1983, Lamb ve Kolakofsky 1996, Mcllhatton ve ark 1997).

1.2.4.2. Yapısal Olmayan Proteinler

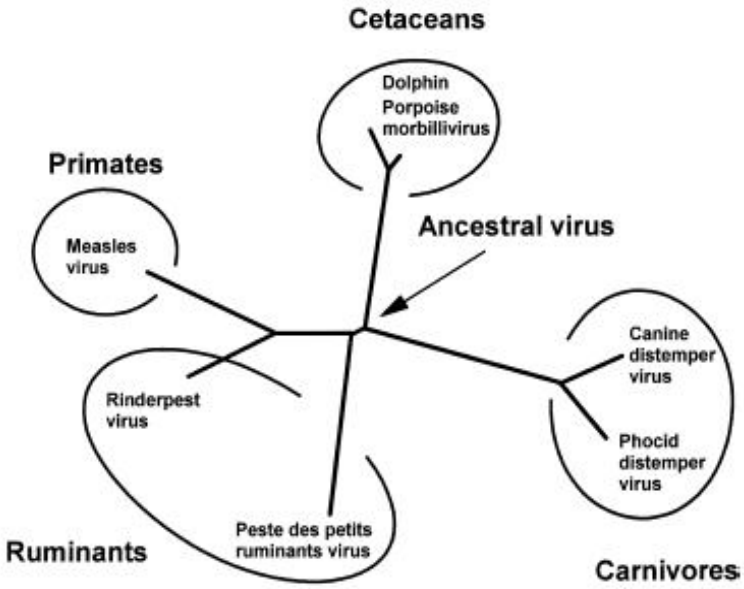
Paramyxoviruslarda 2 tane yapısal olmayan protein (C ve V) bulunmaktadır. Bu proteinler enfeksiyonun oluşmasında ve viral replikasyonda rol oynamaktadır (Lamb ve Kolakofsky 1996, Baron ve Barrett 2000, Barrett ve ark 2006). C ve V proteinleri P geninden köken almaktadırlar (Lamb ve Kolakofsky 1996, Mcllhatton ve ark 1997, Von Messling ve ark 2003).

Viral genom üzerindeki yapısal proteinleri kodlayan genlerin dizilişi 3' yönünden 5' yönüne doğru N-P-M-F-H-L olarak belirlenmiştir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Morbillivirus'ların genom yapısı (Sips ve ark 2007).

Canine Distemper Virusu'nun diğer Morbillivirus'lar ile yakın antijenik ilişkisi bulunmaktadır. Bu ilişki virusların tek bir "Köken Virus" dan orijin alması ile açıklanmaktadır. Bugüne kadar izole edilen Morbillivirus enfeksiyonları, konakçı türü ve antijenik özelliklerine göre yapılan filogenetik analizler sonucunda 4 alt grupta toplanmıştır (Şekil 1.4.).



Şekil 1.4. CDV ve diğer Morbillivirus'ların filogenetik ilişkisi (Barrett 1999).

1.2.5. Virus'un Üretildiği İnvivo ve İnvitro Sistemler

Canine Distemper Virus'ları duyarlı hücre kültürlerinde sitopatik etki (CPE) oluşturarak çoğalmaktadırlar. CDV çeşitli hücre kültürlerinde, embriyolu tavuk yumurtasında, deneme hayvanları olarak da köpek ve gelinciklerde üretilebilmektedir (Von Messling ve ark 2003). Primer hücre kültürlerinde köpek ve gelincik böbrek hücre kültürlerinde, devamlı hücre kültürü olarak African Green Monkey Kidney (VERO) ve Madin Darby Canine Kidney (MDCK) devamlı hücre kültürlerinde üretilebilmektedir (Lednicky ve ark 2004, Maclachlan ve Dudovi 2011).

1.3. Epidemiyoloji

1.3.1. Konakçı Duyarlılığı

Canine Distemper Virus, *Carnivora* takımında bulunan birçok farklı türü kapsayan geniş bir konak aralığına sahiptir. CDV enfeksiyonunun doğal konakçı spektrumunda; *Canidae* (köpek, kurt, tilki, çakal, vahşi köpekler), *Mustelidae* (gelincik, vizon, samur, kokarca, porsuk, sansar) ve *Procyonidae* (rakun, panda, ayı) ailesinin üyeleri bulunmaktadır (Roscoe 1993, Appel ve Summer 1999, Murphy ve ark 1999, Damien ve ark 2002, Maes ve ark 2003, Beineke ve ark 2009, Hoskins 2010, Maclachlan ve Dubovi 2011). Ayrıca CDV enfeksiyonunun deniz memelilerinde de salgınlar şeklinde görüldüğü bildirilmiştir (Osterhaus ve Vedder 1988, Di Guardo ve ark 2005, Wohlsein ve ark 2007, Goldstein ve ark 2009).

Canine Distemper Virus enfeksiyonunun morbidite ve mortalite oranları türler arasında değişkenlik göstermektedir. Ancak özellikle 4-6 aylık genç hayvanların çok daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir. Özellikle annelerinden intrauterin ya da kolostrum yolu ile maternal antikor almamış yavrular en duyarlı grubu oluşturmaktadır (Apel ve Summer 1999, Murphy ve ark 1999). Yapılan çalışmalarda CDV enfeksiyonu üzerinde cinsiyetin önemli olmadığı belirlenmiştir (Headley ve Graca 2000, Zarnke ve ark 2004, Avizeh ve ark 2007).

Canine Distemper Virus enfeksiyonuna karşı ırk predispozisyonunun varlığı kanıtlanmamış olsa da, dolicocephalic (uzun burunlu) türlerin (Greyhound, Sibirya Haski, Samoyed vb) (Şekil 1.5.), brachycephalic (kısa burunlu) türlerden (Chowchow, Bulldog, Pug) daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Headley ve Graca 2000, Pardo 2006) (Şekil 1.6.).


Greyhaond


Sibirya Haski


Samoyed

Şekil 1.5. Dolicocephalic köpek türleri


Bulldog


Chowchow


Pug

Şekil 1.6. Brachycephalic köpek türleri

1.3.2. Bulaşma

Canine Distemper virusu konak dışında enfeksiyözite yeteneğini çabuk kaybettiği için, enfeksiyonun en önemli bulaşma yolu, ateşli dönemdeki enfekte hayvanların diğer duyarlı hayvanlarla olan yakın temasıdır (Murphy ve ark 1999, Maclachlan ve Dubovi 2011, Carvalho ve ark 2012).

Solunum sekretleri ile damlacık enfeksiyonu CDV'unun en önemli bulaşma yoludur. Birbirleri ile yakın temasta bulunan hayvanlar, enfekte damlacıkları alarak enfeksiyona yakalanırlar (Hoskins 2010). Enfekte hayvanların gaitası, idrarı, oral, nazal ve konjunktival akıntıları gibi vücut sekret ve ekstretleri bol miktarda virus içermektedir (Appel ve Summers 1999, Deem ve ark 2000, Leizewitz ve ark 2001, Williams 2001, Von Messling ve ark 2003, Kim ve ark 2006, Beineke ve ark 2009). CDV'u ile enfekte hayvanlar, enfeksiyonu takiben 60-90 gün sonra bile virus saçmaya devam edebilirler (Feliu-Pascual 2009, Hoskins 2010).

Özellikle kış aylarında barınak ve satış yerlerinde toplu olarak barındırılan, kapalı yerlerde birbirlerine çok yakın ve/veya temas halinde olan hayvanlar, enfeksiyonun en önemli bulaşma yolu olan yakın temas için zemin oluşturmaktadır. Virus ile enfekte yem ve su kaplarının sağlıklı hayvanlar tarafından kullanılması da enfeksiyonun bulaşmasında rol oynamaktadır (Hoskin 2010).

Canine Distemper Virus ile enfekte annelerden doğan yavruların transplasental yolla bulaşma sonucu enfekte olabildiği rapor edilmiştir (Appel 1987, Appel ve Summers 1999, Woma 2008).

1.4. Patogenez

Canine Distemper Virus diğer Morbillivirus'lar gibi lenfotropik ve epiteliyotropik karakterdedir. Bu nedenle, multisistemik bir enfeksiyon olan CDV enfeksiyonunun meydana getirdiği en şiddetli lezyonlar lenfoid ve epitel dokudan zengin olan organ sistemlerinde görülmektedir.

Etken vücuda girdikten 1-2 gün sonra lenf yolu ile bronşial, farengial ve tonsillar lenf nodüllerine taşınır. Virusun primer replikasyonu, solunum yolu lenf dokusu hücrelerinde (makrofajlar, T ve B lenfositler) gerçekleşir (Appel 1987, Amude ve ark 2006b, Elia ve ark 2006, Sips ve ark 2007, Feliu-Pascual 2009, Maclachlan ve Dubovi 2011). Virus enfeksiyonu takiben 3.-4. günlerde kan yolu ile kemik iliği, timus, servikal ve mezenteriyal lenf nodüllerine, mide ve barsak lamina propriasındaki makrofajlara taşınır. İki fazlı ateş yükselmesinin ilk fazı gerçekleşir (41 ºC) (Murphy ve ark 1999, Maclachlan ve Dubovi 2011). Bu dönemde lenfopeni şekillenir ve serumda interferon saptanır (Appel 1987, Appel ve Summer 1999, Murphy ve ark 1999). Epiteliyotropik karakterdeki virus buralardan, enfekte lenfositler ve makrofajlar aracılığı ile solunum sistemi, gastro intestinal sistem, genital sistem, ürogenital sistem ve MSS epitellerine taşınarak generalize enfeksiyon oluşur (Appel ve Summers 1999, Hoskins 2010). İkinci faz ateş yükselmesi ile birlikte klinik semptomlar görülmeye başlar.

Merkezi Sinir Sistemi'nde enfeksiyon vücuda girdikten sonra 8.- 10. günlerde, ilk olarak perivasküler lenfositlerde, ardından meningeal makrofajlarda, daha sonra da glia hücreleri ve nöronlarda görülür (Appel 1987). CDV en fazla beynin beyaz maddesinde bulunan glia hücrelerini (oligodentrisitler, astrositler, ependim hücreleri, mikroglia, schwann hücreleri) etkilemektedir ve burada demiyelinizasyon meydana getirmektedir (Zurbriggen ve ark 1998, Vandevelde 2004).

1.5. Patoloji

1.5.1. Makroskobik Bulgular

Canine Distemper Virus enfeksiyonuna ait makroskobik lezyonlar çok küçüktür genellikle sistemik hastalıklardan dolayı ölüm sonrası belirlenebilir. CDV enfeksiyonundan dolayı ölmüş köpeklerde ilk dikkati çeken bulgular; kaşeksi, dehidrasyon ve kaslarda atrofidir (Williams 2001, Pardo 2006, Beineke ve ark 2009). CDV enfeksiyonuna üst solunum yolu enfeksiyonlarının eşlik ettiği durumlarda mukopurulent karakterdeki göz ve burun akıntısı görülmektedir (Demeter ve ark 2009). Nazofarenks, trachea ve bronşlarda serözden purulente kadar değişen eksudatlar mevcuttur. Larenks ve tracheanın mukozasında konjesyon dikkati çeker. İntersitisyel pnömoni şekillendiği durumlarda, akciğer loblarının kırmızıdan kahverengiye alacalı, akciğer dokusunun ise sertleşerek karaciğer benzeri bir görüntü aldığı gözlenir. Viral ve bakteriyel sekonder enfeksiyonlar sonucunda; bronkopnömoni ve akciğerin kranial ve kaudal loblarının yapışması ile karakterize lezyonlar görülebilir (Jones ve ark 1997, Kubo ve ark 2007).

Sindirim sisteminde ortaya çıkan bulgular genellikle non-spesifiktir. Bağırsaklarda gaz birikimi, mide ve bağırsak lümeni içerisinde sıvı artışı görülmesi gibi belirtileri içerir. CDV'unun yol açtığı sinirsel bozukluklara bağlı olarak gelişen megaözafagus dikkat çekicidir (Mosallanejad ve ark 2010). Ağız bölgesinde ise kalıcı dişlerin gelişimi sırasında CDV ile enfekte olan yavruların diş minesi ve köklerinde oluşan defektler belirlenebilir (Williams 2001).

Canine Distemper Virus enfeksiyonlarında deriye ilişkin en önemli makroskobik bulgu ayak tabanlarında görülen hiperkeratik alanlardır. "Hard Pad Disease" olarak tanımlanan bu enfeksiyona viral persistens sonucu bazal tabaka keratinositlerinde gelişen proliferasyonun neden olduğu saptanmıştır (Murphy ve ark 1999, Gröne ve ark 2003, Engelhardt ve ark 2005, Carvalho ve ark 2012). Ayrıca bazı olgularda burun ve göz çevresinde de bu görüntüye rastlanabilmektedir (Appel 1987, Deem ve ark 2000). Abdomende bölgesel olarak püstüler ve veziküler dermatit de göze çarpan bulgular arasındadır (Jones ve ark 1997).

Timus dışındaki lenfoid dokularda belirgin bir değişiklik görülmez iken, timusun belirgin şekilde atrofik olduğu dikkat çekicidir. Hatta bazen nekropsi sırasında görülemeyecek kadar küçük olduğu belirtilmiştir (Williams 2001, Pardo 2006, Kubo ve ark 2007).

Canine Distemper Virus enfeksiyonuna yakalanmış genç köpeklerin kemikleri incelendiğinde, büyüme plaklarının etrafında proliferasyon odakları görülebilir. Bu bozukluklar metafizel osteosklerozis ile ilişkili karakteristik bir bulgudur (Baumgartner ve ark 1995, Pardo 2006, Hoskins 2010). Baumgartner ve ark (1995) makroskobik olarak inceledikleri 3-6 aylık, 42 adet köpeğin 8'inde metafizel osteosklerozis gördüklerini rapor etmişlerdir.

Merkezi Sinir Sistemi'ndeki makraskobik bulgular genellikle minimaldir. Meninkslerde konjesyon, ventrikular dilatasyon ve beyin ödemine bağlı olarak Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'nda artış dikkat çekicidir (Pardo 2006).

1.5.2. Mikroskobik Bulgular

Mikroskobik lezyonlar nekrotik ağırlıklıdır. Enfekte hücrelerde saptanan intrasitoplazmik (i.s.) ve intranükleer (i.n.) inklüzyon cisimcikleri morbillivirus enfeksiyonları için tanısal bir belirleyicidir (Sato ve ark 2006).

Akut CDV enfeksiyonlu hayvanlarda intersitisyel pnömoni gözlenir. Bu hayvanların akciğerlerinde, mononükleer hücre, nötrofil ve fibrin infiltrasyonu görülür. Ayrıca vaskuler konjesyona bağlı olarak da alveoler septumlarda kalınlaşmalar dikkat çekicidir. Alveolar boşluklar nekroze epitel hücreleri ve alveolar makrofajlar içerir. Akciğer epitellerinde alveolar makrofajlardan kaynaklanan eozinofilik karakterde i.s. inklüzyon cisimciklerine rastlanır. CDV enfeksiyonuna eşlik eden *Bordetalla bronchiseptica* gibi sekonder enfeksiyonların varlığında alveoler boşluklarda nötrofil, fibrin ve bakteri birikimleri ile karakterize nekrotik odaklar görülür (Appel 1987, Pardo 2006).

Sindirim sistemindeki inklüzyon cisimciklerine mide mukozasının epitelyum hücrelerinde ve nadiren de bağırsak epitel hücrelerinde rastlanır (Appel 1987). İdrar yolunun transisyonel epitellerinde, böbreklerin renal epitellerinde i.s. inklüzyon cisimcikleri görülebilir (Fukushima ve Helman 1984, Appel 1987, Pardo 2006).

Merkezi Sinir Sistemi mikroskobik bulguları; demiyelinizasyon ile karakterizedir (Moro ve ark 2003, Vandevelde 2004, Sips ve ark 2007). MSS'nin birçok yerinde lezyonlar görülebilir fakat serebellar pedünküllerde, 4. ventrikülün etrafındaki dokuda, medullada, ponsta, serebral kortekste ve bazal gangliyonlarda demiyelinizasyon alanları daha belirgindir. Demiyelinizasyon alanlarında apoptik hücreler dikkat çeker (Guo ve Lu 2000, Moro ve ark 2003, Vural ve Alcigir 2010). CDV enfeksiyonunda; beynin hem beyaz hem de gri maddesinde patolojik değişiklikler görülür. Bu değişiklikler beyaz maddede daha fazladır (Moro ve ark 2003, Amude ve ark 2006b). Kasılma nöbetleri gösteren hayvanlarda beyin gri maddesinde patolojik bulgular görülürken, optik bozukluklar gösteren hayvanların ise beynin beyaz maddesinin daha çok etkilendiği bildirilmektedir (Vandevelde ve Zurbriggen 2005, Amude ve ark 2010). MSS'ne ait i.s. veya i.n. inklüzyon cisimciklerine ağırlıklı olarak astrositlerde, mikrogliyalarda, gangliyon hücreleri ve nöronlarda rastlanır (Pardo 2006). Vural ve Alcigir (2010), CDV enfekte köpekler ile yaptıkları çalışmada demiyelinizasyon alanlarının etrafında bulunan astrositlerde inklüzyon cisimciklerine rastlamışlardır. Moro ve ark (2003) yaptıkları çalışmada ise demiyelinizasyon alanlarında apoptik hücreler belirleyebilmişlerdir.

Canine Distemper Virus ile enfekte genç köpeklerde kemik lezyonları büyük kemiklerde görülür. Baumgartner ve ark (1995) CDV enfeksiyonlu köpeklerde mikroskobik olarak yaptıkları çalışmada kemik iliğinde ve kemik hücresinde viral antijene rastlamışlardır. CDV enfeksiyonunu atlatan köpeklerin diş minesinde hipoplazi dikkat çekici bir bulgudur (Pardo 2006).

Canine Distemper Virus ile enfekte yeni doğmuş köpeklerde kalp üzerinde myokardiyal nekrozlar ve kalsifiye alanlar görülebilir (Higgins ve ark 1981).

CDV'li köpeklerin hiperkeratozisin görülen bölgelerinde yapılan histopatolojik ve immunohistokimyasal çalışmalarda derinin stratum granülozum ve stratum spinozum tabakalarında i.s. ve i.n. inklüzyon cisimcikleri bildirilmiştir (Koutinas ve ark 2004).

Dalak ve lenf nodüllerinde bulunan T ve B lenfositlerde nekroz görülür (Jones ve ark 1997).

Kubo ve ark (2007) 70 köpeğin akciğerinde, 20 köpeğin beyninde, 73 köpeğin mesanesinde, 77 köpeğin dalağında ve 81 köpeğin de lenf nodüllerinde immunohistokimyasal yöntemlerle inklüzyon cisimcikleri belirlediklerini rapor etmişlerdir. Eozinofilik karekterdeki i.s. ve i.n. inklüzyon cisimcikleri; beynin (beyaz ve gri maddesinde) ve omuriliğin glia hücrelerinde, nöronlarda, ependimal ve menegial hücrelerde görülebilir (Appel 1987). CDV enfeksiyonun tanısında oldukça önemli olan i.s. ve i.n. inklüzyon cisimciklerinin lezyonlu dokularda yüksek oranda görülebildiği ifade edilmiştir (Beineke ve ark 2009).

1.6. Klinik Bulgular

1.6.1. Sistemik Bulgular

Canine Distemper Virus enfeksiyonu sırasında görülen klinik belirtilerin çeşitliliği hastalığın multisistemik yapısını ortaya koyar. Epiteliyotropik karakterde olan CDV birçok sistemde enfeksiyona neden olur. Klinik bulgular özellikle solunum, sindirim ve MSS kaynaklıdır. Gelişen klinik bulgular ve hastalığın süresi; virus suşuna, konağın yaşına, immünite durumuna ve ikincil bakteriyel enfeksiyonların varlığına bağlı olarak değişiklik gösterir (Headley ve ark 1999, Williams 2001, Maclachlan ve Dubovi 2011, Carvalho ve ark 2012).

Canine Distemper Virus enfeksiyonunda genellikle akut bir hastalık tablosu görülür. İnkübasyon periyodu 14-18 gündür. CDV çoğunlukla ciddi nasal ve konjuktival akıntıların eşlik ettiği bifazik ateş (39,5-41 ºC) ile karakterizedir. Nasal ve konjuktival, akıntılar hastalığın ilerleyen dönemlerinde sekonder bakteriyel enfeksiyonların da etkisi ile mukopurulent bir hal alır (Hoskin 2010). Ayrıca sekonder bakteriyel enfeksiyonlar bronkopnömoniye de neden olabilir. CDV'lu köpeklerde *Bordetella Bronchiaseptica* yaygın olarak bulunmaktadır. CDV enfeksiyonunda sıklıkla larenjitis, farenjitis, tonsillitis ve bronkopnömoniye bağlı öksürük görülür. Durgunluk, iştahsızlık, kusma, yüksek ateş ve ishale bağlı dehidrasyon diğer klinik belirtilerdendir (Murphy ve ark 1999, Deem ve ark 2000, Carvalho ve ark 2012). Bazı hayvanlarda ise nadiren istemsiz idrar kaçırma ve dışkılama da görülebilmektedir. Kötü bir kokuya sahip olan dışkı sümüksü yapıda olup, şeritler halinde kan damlacıkları içerebilir (Gillespie ve ark 1956).

CDV enfeksiyonunu atlatan hayvanlarda retina atrofisine bağlı olarak retinal lezyonlar, lakrimal bezlerin kabuklaşmasına bağlı olarak da Kerata Konjuktivitis Sicca (KKS) görülebilir (De Almeida ve ark 2009, Hoskins 2010).

1.6.2. Nörolojik Bulgular

Merkezi Sinir Sistemi bulguları, hastalığın sistemik bulguları ile eş zamanlı olarak ortaya çıkabildiği gibi, hastalığın iyileşme sürecini takiben de görülebilmektedir. Bu süre yaklaşık 1-5 hafta arasında değişmektedir (Williams 2001, Pardo 2006).

Canine Distemper Virus nörolojik bulguları, değişken olmakla birlikte sıklıkla enfeksiyondan etkilenmiş sinir dokusunun dağılımı ile ilişkilidir. Ekstremite kaslarının etkilendiği durumlarda hayvanda yürüme bozukluğu şekillenir. Bazı durumlarda parezis veya paralizler görülür. Optik nöron lezyonlarına bağlı olarak görme bozukluğu oluşabileceği bildirilmiştir. CDV enfeksiyonunda karakteristik belirti ise; beynin beyaz maddesinin etkilenmesinden kaynaklanan, kas gruplarında meydana gelen istemsiz kasılmalar ile karakterize myoklonustur (Amude ve ark 2007). Myoklonustan masseter, temporal ve periorbital kaslar etkilenir. Temporal lobdaki gri maddenin nekrozu ile çene kaslarının istemsiz hareketlerini ifade eden "chewing gum" tipi krizler sıklıkla görülebilmektedir (Deem ve ark 2000, Williams 2001, Pardo 2006).

Canine Distemper Virus ile enfekte yaşlı köpeklerde (6 yaş ve üzeri) hastalık genelde ensefalomiyelitis ile seyreder. Hastalığın bu formuna "Old Dog Ensafalitis" veya "Multifokal Distemper Ensefalomyelitis" denir (Jones ve ark 1997, Murphy ve ark 1999).

1.6.3. Diğer Bulgular

Canine Distemper Virus enfeksiyonu gebe hayvanlarda aborta, zayıf ve hasta yavruların doğmasına neden olur. Hastalıklı doğan yavrularda diş gelişimi ile ilgili problemler, kardiyomiyopati, dispne, depresyon, anorexia ve halsizlik görülür (Williams 2001, Pardo 2006).

Canine Distemper Virus enfeksiyonlarında aynı zamanda romatoid arthritit ve eklemlerde sertleşme görülmektedir. 3-6 ay arasındaki büyük ırk köpekler daha sık etkilenmektedir. Topallık gösteren hayvanların uzun kemiklerinin radyografisi çekildiğinde metafizel lezyonlara rastlanabilir (Hoskins 2010).

Burunda, göz çevresinde özellikle de ayak taban derisinde keratonositlerin proliferasyonundan kaynaklandığı düşünülen hiperkeratozis şekillenmektedir (Appel 1987, Pardo 2006, Feliu-Pascual 2009).

1.7. İmmunoloji

Canine Distemper Virus enfeksiyonunun klinik görünümünün şiddeti, hayvanın yaşı ve ırkının yanı sıra, hücresel ve humoral yanıta bağlıdır (Williams 2001, Beineke ve ark 2009). Yeterli hücresel immuniteye sahip olmayan hayvanlarda immunsupresyon gelişir ve şiddetli bir hastalık tablosu şekillenir (Appel ve Summers 1999). CDV enfeksiyonunda T lenfositler (Th, Tc) B lenfositlerden daha fazla etkilenmektedir ve daha hızlı yok olmaktadır (Appel ve Summers 1999, Vandevelde 2004). T lenfosit hücrelerinden ise, CD4 yüzey moleküllerine sahip yardımcı T lenfositler (Th), CD8 yüzey molekülüne sahip baskılayıcı T lenfositlerinden (Tc) daha hızlı etkilenir (Vandevelde 2004). Etkilenen T ve B lenfositleri, lenfotik dokularda nekrozise neden olur (Appel ve Summers 1999, Carvalho ve ark 2012).

Enfeksiyonu takiben 9-14. günler arasında hücresel ve humoral savunma sistemi etkili olur (Deem ve ark 2000). Eğer gelişen immun yanıt kuvvetli ve erken dönemde gelişmiş ise; virus lenfoid dokularda elimine edilir ve subklinik enfeksiyon meydana gelir (Appel ve Summers 1999, Feliu-Pascual 2009). Orta düzeyde gelişen immun yanıt, etkeni yavaş yavaş lenfotik dokulardan ve organlardan elimine eder. Fakat MSS, konjuktiva ve deride persiste olarak kalmaya devam edebilir (Stettler ve ark 1997, Deem ve ark 2000, Williams 2001, Feliu-Pascual 2009). Zayıf immun yanıt şekillenir ise akut form gelişir. Etken deri, ekzokrin-endokrin bezler, sindirim, solunum ve genital sistem gibi birçok dokuyu enfekte eder. Bu aşamada birçok klinik belirti görülür (Deem ve ark 2000). Sekonder bakteriyel etkenlerin de etkisi ile klinik tablo daha şiddetli görülebilir (Pardo 2006).

1.8. Teşhis

1.8.1. Klinik Teşhis

Klinik açıdan CDV teşhisi öncelikle anamnez ve klinik semptomlar üzerinden konulur. Öncelikle klinik semptom gösteren 3-6 aylık arası aşısız hayvanlar CDV açısından şüphelidir.

Sadece klinik belirtilere dayanarak kesin tanı koymak oldukça zordur. Diğer bazı laboratuvar testleri teşhis için mutlaka gereklidir (Woma 2008).

1.8.2. Hematolojik Teşhis

Akut CDV enfeksiyonu geçiren bir köpeğin hematoloji profilinde, anemi, trombositopeni, lökopeni, lenfopeni, nötropeni ve monositopeni dikkat çeker (Şen 1998, Appel ve Summers 1999, Deem ve ark 2000, Woma 2008). Enfeksiyonun akut döneminde kanda, nasal ve oküler sürüntülerde, idrarda, BOS'da virusa ait inklüzyon cisimcikleri görülebilir (Alleman ve ark 1992, Maes ve ark 2003). İnklüzyon cisimcikleri Wright boyası ile boyamada gri, Schorr boyası ile boyamada ise kırmızı renkte görülmektedir (Woma 2008).

Canine Distemper Virus enfeksiyonlarında hipoalbuminemi, hiperglobulinemi ve hipokalemi serum biyokimyasına ilişkin bildirilmiş değişikliklerdir. CDV ile enfekte edilmiş 6-10 günlük gnotobiyotik yavruların serum kalsiyum konsantrasyonlarının dikkat çekici biçimde düştüğü belirtilmiştir (Woma 2008).

1.8.3. Serolojik Teşhis

Serolojik testler, hastalığın tanısında ya da aşılama sonrası kontrollerde antikor (Ab) varlığının ve titresinin belirlenmesinde kullanılır. Serumdaki CDV titresinin belirlenmesi teşhise yardımcı olur (Appel ve Summers 1999, Pardo 2006).

Akut enfeksiyon döneminde saptanan özgül IgM varlığı ya da konvalesan dönemde IgG saptanması klinik tanıyı doğrulamada yardımcı olur.

Canine Distemper Virus'una karşı oluşturulan spesifik Ab'lerin tespit edilmesi amacı ile İndirekt İmmun Floresan (İİF) Ab testi (Avizeh ve ark 2007) ve İndirekt Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılabilir (Bernard ve ark 1982, Blixenkrone -Moller ve ark 1991, Gemma ve ark 1995, Von Messling ve ark 1999, Kelly ve ark 2005, Çalışkan ve Burgu 2007, Gençay ve ark 2012)

İndirekt ELISA'nın uygulanması sırasında, hücre kültürü sistemlerine ihtiyaç duyulmaması, indirekt IF testine göre daha kısa sürede sonuç alınabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu metot ile IgM varlığı ya da IgG varlığı tespit edilebilir.

Avizeh ve ark (2007) 97 adet sağlıklı görülen, aşılanmamış, 6 aylık köpeklerin kan serum örneklerini indirekt IF testi ile incelemiş, 17 (%17.52) adedinde serumda Ab varlığını belirlemişlerdir.

Nötralizasyon testi, enfeksiyona karşı korunmanın ölçülmesinde altın standart olarak kabul edilirken, serum titresi, korunmanın derecesi hakkında bilgi verir (Gençay ve ark 2004, Woma 2008).

1.8.4.Virolojik Teşhis

Virolojik tanıda birçok klinik örnek (nazal ve konjuktival akıntılar, lökosit ve dışkı) kullanılabilir. Direkt IF Testi, Direkt ELISA, Virus Nötralizasyon Testi (VNT) (Gemma ve ark 1996) ve İmmunokromatografik yöntemler CDV ile enfekte hayvanların tespitinde kullanılabilecek yöntemler arasında yer alır.

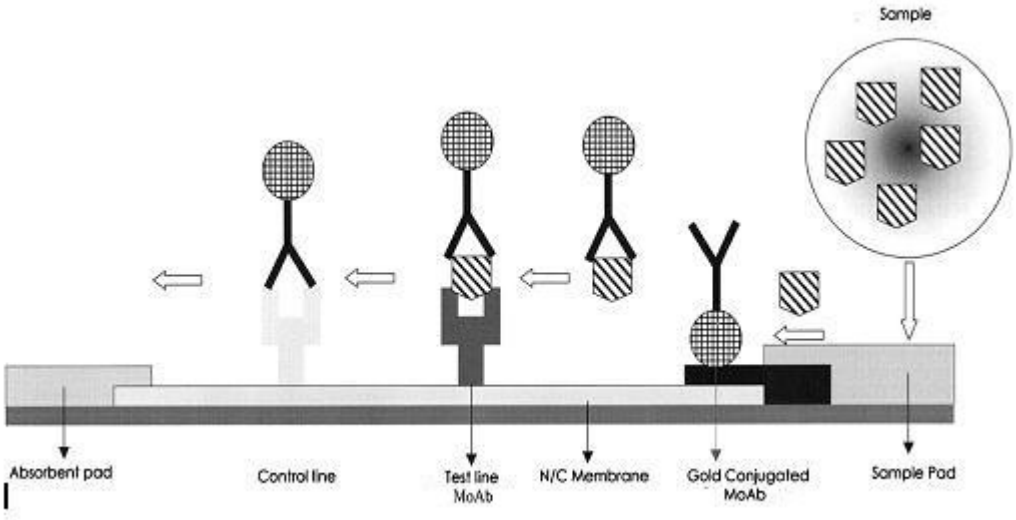
Kan, BOS, idrar sedimenti, kemik iliği, konjuktival, genital ve solunum sistemi epitel hücrelerinden hazırlanan preparatlar, direkt IF yöntemi ile CDV teşhisinde kullanılabilir (Maes ve ark 2003, Elia ve ark 2006, Woma 2008, Hoskin 2010).

Direkt ELISA viral antijen (Ag)'in belirlenmesine yönelik yapılan bir testtir. Enfekte hayvanların tam kanı veya BOS kullanılarak CDV etkeninin teşhisi yapılabilmektedir (Woma 2008).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), CDV tanısında yaygın olarak kullanılan hızlı ve güvenilir metotlar arasında yer almaktadır (Frisk ve ark 1999, Elia ve ark 2006, Pardo 2006, Calderon ve ark 2007). RT-PCR tekniği hem canlı hem de ölmüş hayvana ait örneklerde, hastalığın formuna, immün yanıta ve viral Ag dağılımına bağlı kalmadan uygulanabilen bir yöntemdir (Frisk ve ark 1999, Elia ve ark 2006). Kandan, konjuktival akıntılardan, dokulardan (akciğer, karaciğer, lenf nodülleri, beyin ve dalak) ve idrardan RNA tespiti yapılabilmektedir (Shin ve ark 1995, Frisk ve ark 1999, Deem ve ark 2000, Kim ve ark 2001, Maes ve ark 2003, Shin ve ark 2004, Amude ve ark 2006a, 2007, Kim ve ark 2006, Saito ve ark 2006, Calderon ve ark 2007, Latha ve ark 2007b, Lan ve ark 2008, Demeter ve ark 2009, Feliu-Pascual 2009, Hoskins 2010).

Canine Distemper Virus izolasyonu için en uygun dönem enfeksiyonun akut ya da subakut dönemidir (Appel 1987). CDV izolasyonu kan, konjuktival eksudat ve dokulardan yapılabilmektedir (Appel ve Summers 1999). CDV izolasyonu yaygın olarak, VERO ve MDCK devamlı hücre kültürlerinde yapılmaktadır. CPE oluşumu virus suşuna ve hücre hattına göre farklılıklar gösterir (Lednicky ve ark 2004, Maclachlan ve Dubovi 2011).

İmmunokromatografi tekniği son zamanlarda sık kullanılan bir yöntemdir (Woma 2008). Bu yöntemde şüpheli hayvanların konjunktival ve nazal swapları, tam kan, plazma, serum ve lökositleri ve hatta dışkı örnekleri kullanılabilmektedir. İmmunokromatografi tekniği ile hazırlanan rapid testler 10-20 dk içerisinde sonuç vermektedir. Çalışma prensipleri nitroselüloz membrana adsorbe edilen Gold-Conjugated CDV-MAb ve Anti CDV monoklonal Ab'ların, örneklerdeki CDV Ag'leri ile sandviç oluşturması esasına dayanmaktadır (An ve ark 2007, Kang ve ark 2007) (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. İmmunokromatografik yöntem (Kang ve ark 2007).

1.9. Korunma ve Kontrol

Koruma ve kontrol amaçlı 1940'lı yıllardan itibaren aşı kullanımına başlanmıştır. Ancak bu yıllarda kullanılmaya başlanan inaktif CDV aşısının enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında yeterli olmadığı belirtilmiştir (Appel ve Summers 1999). Enfeksiyon ile mücadelede 1950'den itibaren kullanılmaya başlanan canlı CDV aşılarının daha koruyucu özellikte olduğu bildirilmiştir (Bolt ve ark 1997, Iwatsuki ve ark 2000, Rzezutka ve Mizak 2003, Rikula 2008). Günümüzde de uygulanmakta olan canlı CDV aşıları ve aşı programları sayesinde enfeksiyonun kontrol altına alındığı ifade edilmiştir (Maclachlan ve Dubovi 2011).

Maternal Ab'lar, erken dönemde hastalıktan korunmada en önemli yoldur. Köpeklerde maternal Ab'lar anneden yavruya plasenta ve kolostrum yoluyla aktarılır. Anneden yavruya geçen Ab'ların yaklaşık %3'ü uterus, %97'si kolostrum aracılığı ile gerçekleşir (Pardo 2006). CDV antikorlarının transplasental yolla az miktarda aktarılmasına rağmen, esas Ab geçişi kolostrum ile alınan maternal Ab'ların ince bağırsaktan emilimi ile gerçekleşir. Aşılı annelerden doğan yavrular, kolostrum almasalar da enfeksiyona karşı 1-2 hafta korunma sağlayacak miktarda Ab'a sahiptirler (Pardo ve ark 2007).

Kolostrum aldığı kabul edilen yavrularda aşılamaya 6-8 haftalıkken başlanır ve 3-4 hafta aralıklarla tekrarlanır. Bir yıl sonra booster aşı uygulanır ve 3 yılda bir tekrarlanır (Murphy ve ark 1999, Feliu-Pascual 2009). Kolostrum ile maternal Ab almamış yavrular ise aşı sonrası öldürücü ensefalitis şekillenebileceğinden 4 haftalıktan önce aşılanması uygun değildir (Appel ve Summers 1999).

Canine Distemper Virus enfeksiyonuna karşı korunmanın en güvenilir yolu aşılamadır (Appel 1987, Chappuis 1995, Vandevelde 2004, Latha ve ark 2007a, Feliu-Pascual 2009). Günümüzde halen CDV enfeksiyonuna karşı modifiye canlı aşılar kullanılmaktadır (Appel ve Summers 1999, Helsinki 2008). Kullanılan modifiye canlı aşılar; dondurulmuş-kurutulmuş formda, adenovirus, parvovirus, parainfluenza-2 ve leptospira ile kombine olarak uygulanmaktadır. Bu aşılar, embriyolu tavuk yumurtası ya da hücre kültürü orijinlidir (Latha ve ark 2007a). Her iki metot ile yapılan aşılar, güçlü bir immunite sağlayıp, en az 1 yıl süre ile koruma sağlanmaktadır (Appel ve Summers 1999). Kullanılan aşılar liyofilize formda olsa bile virusun ısı hassasiyeti vardır. Bu nedenle aşılamanın yapıldığı sıcak iklimlerde aşının soğuk zincirde muhafaza edilmemesi sorun oluşturabilmektedir.

1.10. Tedavi

CDV enfeksiyonuna karşı bilinen etkin bir tedavi bulunmamaktadır (Leizewitz ve ark 2001, Williams 2001, Vandevelde 2004, Pardo 2006, Woma 2008, Hoskins 2010). Ancak gelişen sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi uygulanabilir (Murphy ve ark 1999). Sekonder enfeksiyonlarda en çok solunum ve sindirim sistemini etkileyen *Bordetella bronchiseptica*'ya rastlanmaktadır (Woma 2008). Sistemik tedavi olarak kusmayı engellemek için antiemetikler, diyare ve kusma ile sıvı kaybetmiş hayvanlara da sıvı elektrolit tedavisi uygulanabilir (Pardo 2006, Feliu-Pascual 2009, Hoskin 2010). Nörolojik atakları önlemek için antikonvüzyonel ilaçlar kullanılabilir (Williams 2001, Woma 2008). Destekleyici tedavi olarak da iştah arttırmak için B vitamini, MSS'ndeki doku hasarını azaltmak için de A, C, E vitaminleri kullanılabilir. Yarım ve Yağcı (2006) yaptıkları çalışmada CDV enfeksiyonlu köpeklerin sağlıklı köpeklere oranla vitamin A değerlerinin düştüğünü belirlemişlerdir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

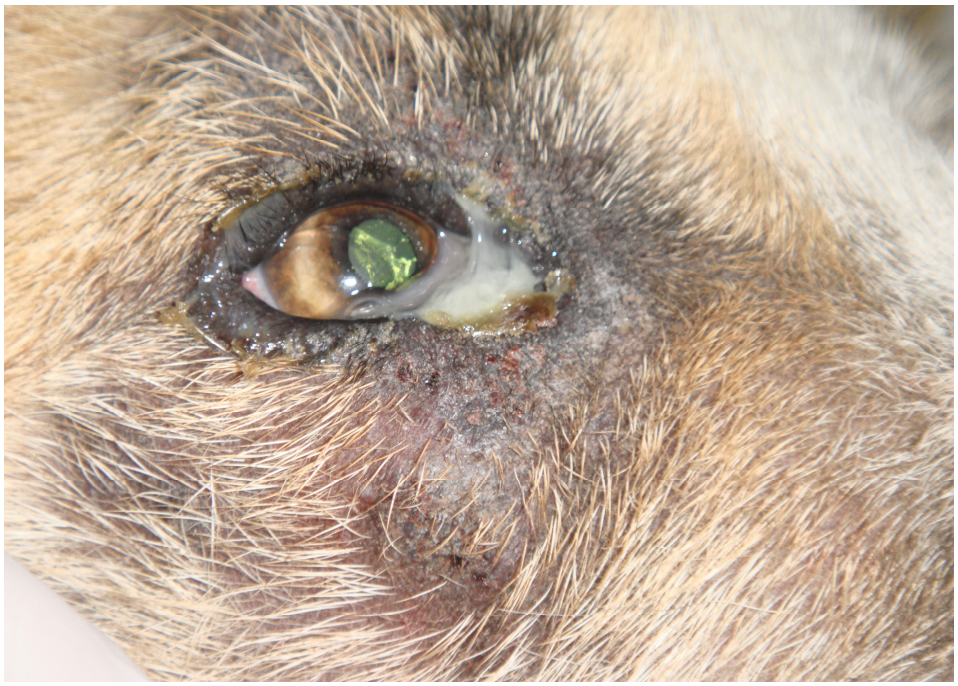
2.1. Gereç

2.1.1. Araştırmada Örneklenen Hayvanlar

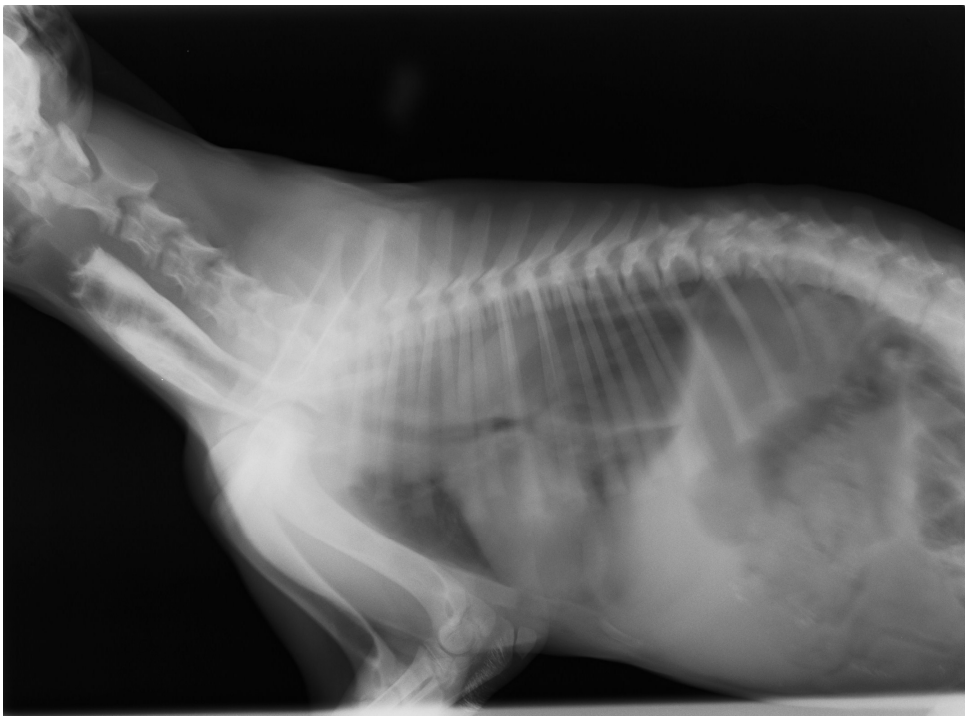
Araştırmada örneklenen hayvanlar, Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi'nden, Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı'ndan ve Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi'nden, ayrıca Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'nden ve Konya ve çevresinde bulunan serbest pet kliniklerinden temin edildi. Örnekleme yapılırken yüksek ateş, solunum, sindirim ve/veya sinir sistemi enfeksiyonlarına ait bulgular gösteren hayvanlar (Şekil 2.1., Şekil 2.2., Şekil 2.3., Şekil 2.4., Şekil 2.5.) tercih edildi.



Şekil 2.1. Mukopurulent karakterdeki burun akıntısı görünümü (15 numaralı örnek).



Şekil 2.2. Mukopurulent karakterdeki göz akıntısı ve göz çevresinde hiperkeratozis görüntüsü (50 numaralı örnek).



Şekil 2.3. CDV enfeksiyonlu köpekte megaözafagusun radyolojik görünümü (77 numaralı örnek).



Şekil 2.4. CDV enfeksiyonlu kaşektik köpek görüntüsü
(55 numaralı örnek).



Şekil 2.5. CDV enfeksiyonlu kaşektik köpek görüntüsü
(66 numaralı örnek).

2.1.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı laboratuvarında hazırlanan VERO devamlı hücre kültürü kullanıldı. Hücre kültürlerinde idame vasat olarak; 25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin ve %10 Fötal Dana Serumu (FDS) (Biological Industries, Israil) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanıldı.

2.1.3. Fötal Dana Serumu

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli olan FDS ticari olarak temin edildi. Steril olarak gelen FDS'ler kullanılana kadar -20 ºC'da muhafaza edildi. Kullanıma alınmadan önce 56 ºC'da 30 dk inaktivasyonu yapılarak porsiyonlandı.

2.1.4. Serolojik Kontrol Materyali

2.1.1.'de belirtilen klinik belirti gösteren 0-12 ay arası farklı ırklardaki köpeklerden (116 adet) serum için kan örnekleri toplandı (Çizelge 2.1.).

2.1.5. Virolojik Kontrol Materyali

2.1.1.'de belirtilen klinik belirti gösteren 0-12 ay arası farklı ırklardaki köpeklerden (116 adet) lökosit için kan örnekleri toplandı (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Örneklenen hayvanların sağlandıkları yerlere göre dağılımı.

Örneklerin Toplandığı Yerler	Toplam
Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi	40
Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı	21
Adana Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi	15
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi	28
Serbest Klinikler	12
TOPLAM	**116**

2.2. Yöntem

2.2.1. Serolojik Çalışmalar

2.2.1.1. Kan Serum Örneklerinin Hazırlanması

Köpeklerde *Vena Sephena*'nın bulunduğu bölge alkol ile silindikten sonra, yaklaşık 7-8 mililitre (ml) kan steril EDTA'sız tüplere alındı. Örnekler soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. 3000 devir/dk (rpm)'da (Hettich, Almanya) 10 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj ile ayrılan kan serumu örnekleri steril pipet yardımı ile 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarıldı. Toplanan serumlar su banyosunda 56 ºC'de 30 dk inaktive edildi. Serum örnekleri test aşamasına kadar -20 ºC'lık derin dondurucuda saklandı.

2.2.1.2. İndirekt ELISA

Hazırlanan kan serum örneklerinde, CDV'ye karşı gelişen antikorların (spesifik IgG) varlığı araştırıldı. Bu amaçla ticari olarak temin edilen indirekt ELISA kiti (Agrolabo, İtalya) kullanıldı.

İndirekt ELISA Kitinin İçeriği:

Her kit antijen ile kaplı 96'lık mikropleyt, sulandırma solüsyonu, anti-canine IgG peroksidaz konjugatı, negatif kontrol serumu, pozitif kontrol serumu, 10× konsatre yıkama solüsyonu, substrat ve stop solüsyonu içermektedir.

2.2.1.3. İndirek ELISA Testinin Uygulanması

Soğuk zincirde muhafaza edilen serum örneklerinin uygulamaya başlamadan 1 saat önce oda ısısına gelmesi sağlandı. Serum örnekleri U tabanlı pleytlerde 1/100 oranında sulandırıldı (5 mikrolitre (µl) serum, 495 µl sulandırma solüsyonu). A1 gözüne 100 µl pozitif kontrol (PK), B1 gözüne 100 µl negatif kontrol (NK) konuldu. Diğer gözlere (C1,D1,E1 vb) daha önce 1/100 oranında sulandırılan serum örneklerinden 100 µl ilave edildi. Oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda mikropleyt ters çevrilerek boşaltıldı. 1/10 oranında sulandırılarak hazırlanılan yıkama solüsyonundan her göze 300 µl aktarılarak yapılan yıkama işlemi 4 kez tekrar edildi. Kullanıma hazır halde bulunan konjugattan 100 µl kontrol gözleri de dahil olmak üzere tüm gözlere konuldu. Mikropleytin üzeri kapatılarak oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda mikropleytler yukarıda belirtildiği şekilde 4 kez yıkandı. Daha sonra hazır halde bulunan substrattan tüm gözlere 100 µl konuldu. Mikropleytin üzeri kapatılarak 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda pleytler boşaltılmadan tüm gözlere (PK ve NK gözleri dahil), 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Mikropleytler sonuçları değerlendirmek üzere ELISA okuyucusuna yerleştirildi.

2.2.1.4. Testin Değerlendirilmesi

Sonuçlar, ELISA okuyucusunda (Rayto RT-2100C, Çin) 450nm dalga boyuna sahip filtre kullanılarak Optik Dansite (OD) değerleri belirlendi ve sonuçlar kit prosedürüne göre değerlendirildi.

2.2.1.5. Testin Geçerliliği

Testin geçerli olduğu aşağıdaki değerlere bakılarak değerlendirildi;

$OD_{Negatif\ Kontol\ 450}\ (OD_{NK}) < 0,2$

$OD_{Pozitif\ Kontol\ 450}\ (OD_{PK}) > 1$

2.2.1.6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Pozitif kontrol kullanılarak testin "Cut Off" değeri hesaplandı;

$Cut\ Off = OD_{PK} \times 0,2$

Pozitif Örnek > Cut Off

Negatif Örnek < Cut Off

2.2.2. Virolojik Kontroller

2.2.2.1. VERO Devamlı Hücre Kültürü Hazırlanması

VERO devamlı hücre kültürleri 250 ml'lik flasklarda (Corning, ABD) çoğaltıldı. Hücre üretme vasatı olarak %10 FDS içeren DMEM kullanıldı. Hücreler serumlu DMEM kullanılarak CO_2'li etüvde 37 ºC'da inkübasyona bırakıldı. Her gün doku kültürü mikroskobu (Olympus, Tokyo) ile kontrol edilen hücreler şişe yüzeyini (en az %80) kaplayınca tripsin ile yüzeyden kaldırıldı. DMEM ile sulandırılarak hücre süspansiyonu (300.000 hücre/ml) hazırlandı ve 96 gözlü mikropleytlere geçirildi. Pleytler 37 ºC'da CO_2'li etüve kaldırılarak inkubasyona bırakıldı. Hücre gelişimi takip edildi.

2.2.2.2. Kan Lökosit Örneklerinin Hazırlanması

Köpeklerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara getirildi. 3000 rpm'de (Hettich, Almanya) +4 ºC'da 10 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte üç tabakaya ayrılan (dipte eritrosit, ortada lökosit ve en üstte plazma) kandan, otomatik pipet ile lökosit tabakası antibiyotikli (25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin) Phosphate Buffer Saline-Minus (PBS-M) içinde 3 kez santrifüj edilerek yıkandı. Son yıkama işlemini takiben elde edilen lökositler 1.5 ml DMEM + %10 Dimethylsulphoxide (DMSO) içinde sulandırılarak, kullanılıncaya kadar -80 °C'lık derin dondurucuda saklandı.

2.2.2.3. VERO Hücre Kültürüne Lökosit Örneklerinin Ekimi

Yöntemine uygun olarak hazırlanan lökosit örnekleri ile 24 gözlü gözlü mikropleytlerde monolayer olarak çoğaltılan hücrelere adsorbsiyona bağlı ekim tekniği kullanılarak ekildi. Mikropleytte hücre kontrol ve örnekler için 2'şer göz ayrıldı. Bu amaçla daha önce hücreye ekim için hazırlanan lökosit süspansiyonlarından steril pipetler ile her göze 200 µl inoküle edildi. Hücre kontrole 200 µl DMEM konuldu. Pleytler tekrar CO_2'li etüvde, 37 ºC'da 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyon süresi sonunda virus üretme vasatı olarak 2 ml serumsuz DMEM ilave edildi. Tekrar 37 ºC'da CO_2'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Hücreler 7 gün süre ile doku kültürü mikroskobunda (Olympus, Tokyo) CPE yönünden kontrol edildi. Daha sonra pleyt -80 ºC'da dondurulduu. Bir sonraki pasaj için 37 ºC'da benmaride çözdürülerek, pleyt santrifüjünde 3000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı bir sonraki pasaj için kullanıldı. Bu işlem 5 kez tekrar edildi.

2.2.2.4. Rapid Testte Kullanılacak Kan Serum Örneklerin Hazırlanması

Yöntemine uygun olarak hazırlanan kan serum örnekleri, Rapid test kitinden çıkan dilüent ile prosedüre uygun olarak ½ oranında sulandırıldı.

2.2.2.5. Rapid Test

Testte Rapidy firmesı tarafından üretilen rapid test kiti kullanıldı.

Rapid Test Kitinin İçeriği:

Her kit 1 adet damlalık, 1 adet test kaseti içeren alüminyum folyo kese, 1 adet içerisinde çözelti bulunan örnek toplama tüpü ve 1 adet swap içermektedir.

2.2.2.6. Testin Uygulanması

Rapid test prosedürüne uygun olarak hazırlanan örnekler kasetin üzerinde "S" yazan göze damlalık ile 3-4 damla damlatıldı. 5-10 dk beklenerek sonuçlar yorumlandı.

2.2.2.7. Testin Değerlendirilmesi

Test kasetinin gözünde sadece kontrol bandı oluşmuş ise negatif, kontrol bandının yanında örnek bandı da oluşmuş ise pozitif olarak değerlendirildi. Eğer sonuç gözünde kontrol bandı görülmemiş ise test geçersiz sayıldı.

2.2.2.8. İstatistiki Analiz

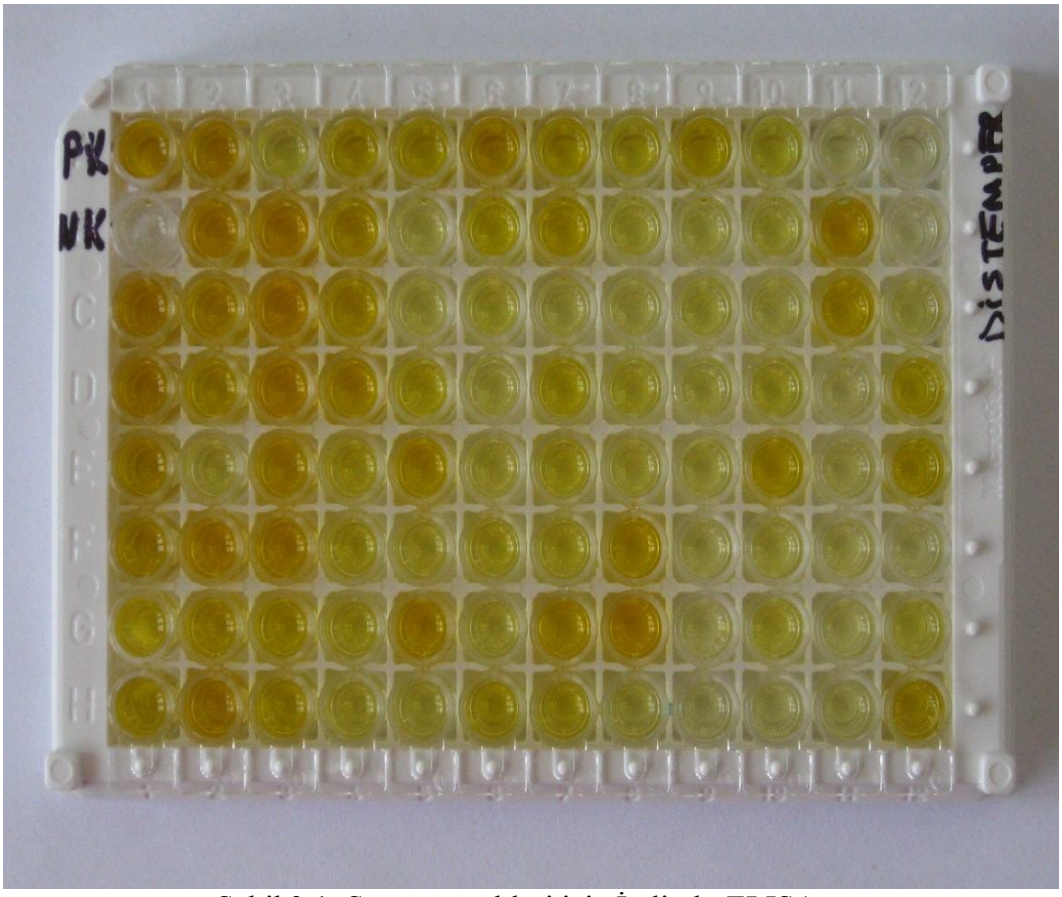
Araştırmanın sonuçları ki kare (X^2) kullanılarak hesaplandı (Minitab 14.0). $P<0.05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Serolojik Çalışma Sonuçları

3.1.1. İndirekt ELISA Sonuçları

İndirekt ELISA ile incelenen 116 adet köpeğe ait kan serum örnekleri CDV'ye karşı gelişen Ab'lar (IgG) yönünden değerlendirildi. Değerlendirme sonunda 70 örnekte (%60,34) CDV'ye karşı oluşan IgG Ab varlığı saptandı. Örneklerden 46 adeti ise (%39,65) CDV'ye karşı oluşan Ab varlığı yönünden negatif olarak kabul edildi (Şekil 3.1.) (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.1. Serum örnekleri için İndirekt ELISA.

Çizelge 3.1. Örneklerin toplandığı yerler ve İndirek ELISA sonuçları.

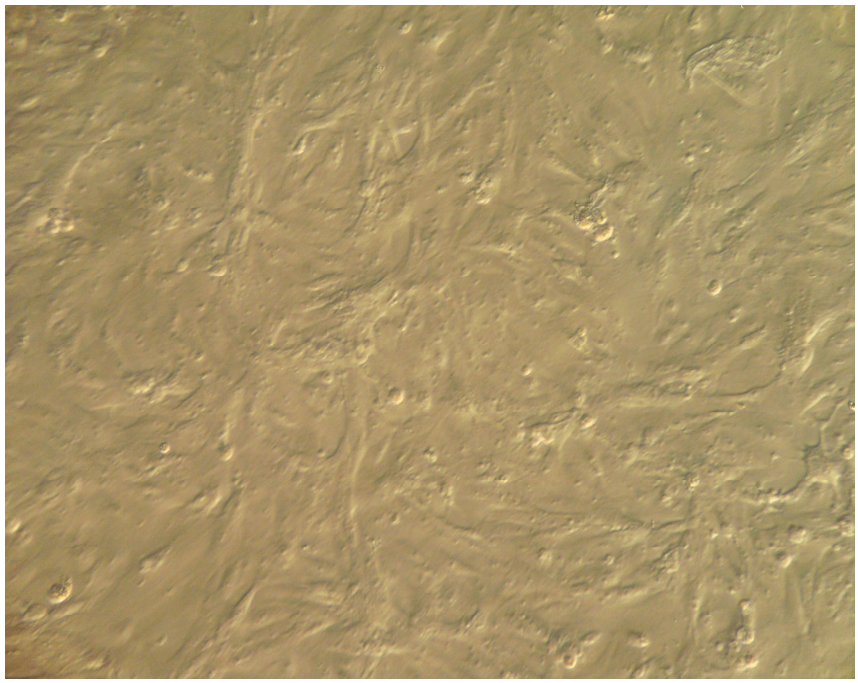
Örneklemenin yapıldığı yerler	IgG ELISA (+) %	IgG ELISA (-) %	TOPLAM
Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi	28 (%70)	12 (%30)	**40**
Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı	18 (%85,7)	3 (%14,2)	**21**
Adana Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi	3 (%20)	12 (%80)	**15**
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi	14 (%50)	14 (%50)	**28**
Serbest Klinikler	7 (%58,3)	5 (%41,6)	**12**
TOPLAM	**70**	**46**	**116**

3.2. Virolojik Çalışma Sonuçları

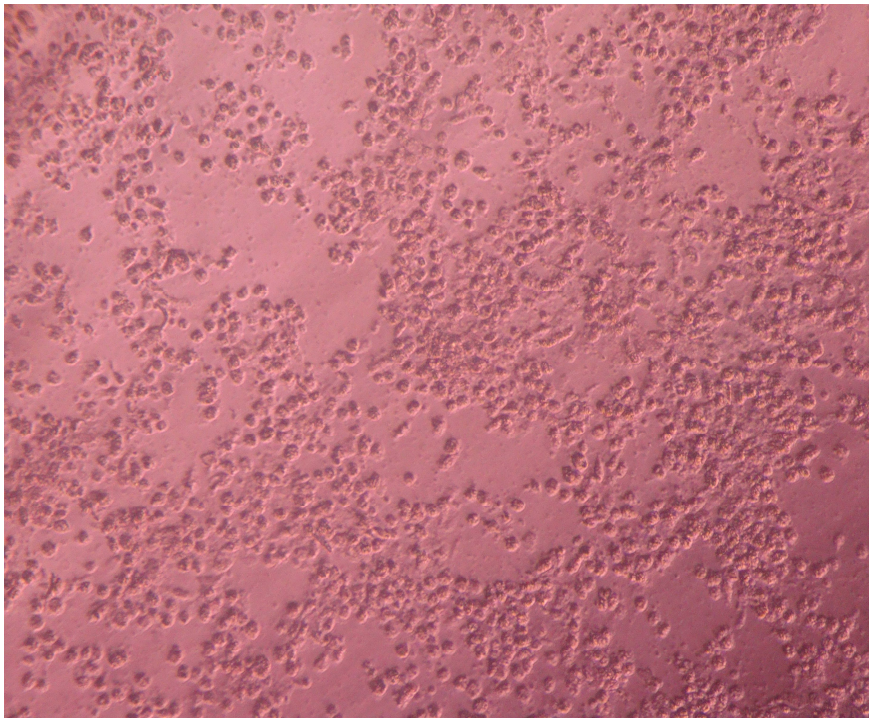
3.2.1. Hücre Kültürü İnokülasyonu Sonuçları

Doku kültürüne ekimi yapılan örnekler, VERO hücre kontrolü ile karşılaştırılarak invert doku kültürü mikroskobunda CPE yönünden incelendi (Şekil 3.2., Şekil 3.3.).

İncelenen 116 adet köpek lökosit örneklerinin 45'inde hücre kültüründe CPE varlığı tespit edildi.



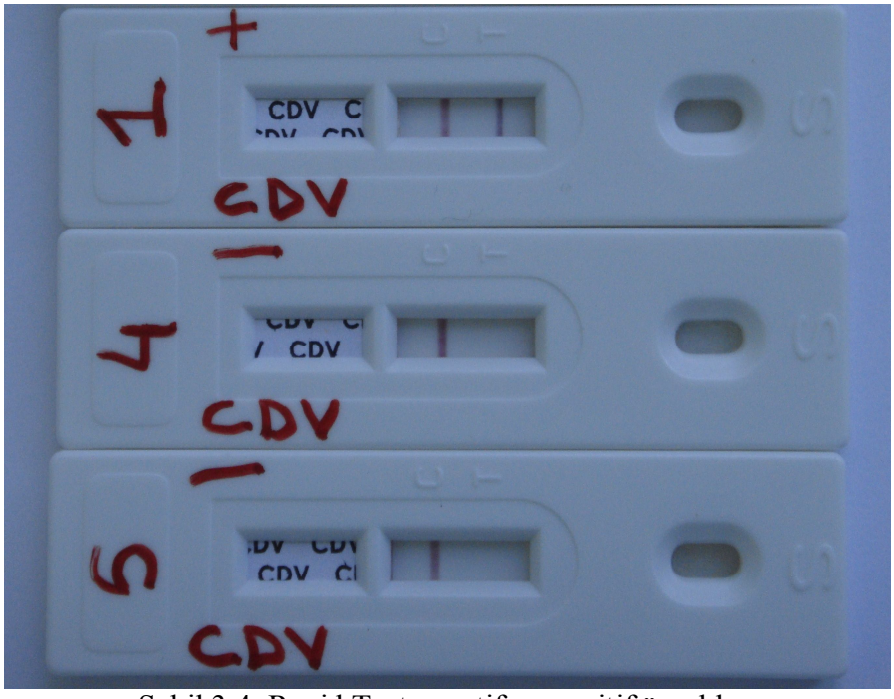
Şekil 3.2. VERO Devamlı Hücre Kültürü (Hücre Kontrol, ×200).



Şekil 3.3. VERO Hücre Kültürlerine ekimi yapılan lökosit örneklerinin hücrelerde 7 gün sonra meydana getirdiği CPE'ler (×200).

3.2.2. Rapid Test Sonuçları

Rapid Test ile incelenen 116 adet köpeğe ait kan örneklerinden 40 adedi (%34,48) CDV Ag varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken, 76 adedi (%65,51) negatif olarak belirlendi (Şekil 3.4.) (Çizelge 3.2.).



Şekil 3.4. Rapid Test negatif ve pozitif örnekler.

Çizelge 3.2. Örneklerin toplandığı yerlere göre ve CDV Rapid Test sonuçları.

Örneklemenin yapıldığı yerler	**Rapid Test (+) %**	**Rapid Test (-) %**	**TOPLAM**
Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi	8 (%20)	32 (%80)	**40**
Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı	14 (%66,6)	7 (%33,3)	**21**
Adana Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi	2 (%13,3)	13 (%86,6)	**15**
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi	14 (%50)	14 (%50)	**28**
Serbest Klinikler	2 (%16,6)	10 (%83,3)	**12**
Toplam	**40 (%34,48)**	**76 (%65,51)**	**116**

3.3. İstatistiki Sonuçlar

3.3.1. Testler Arası Spesifite ve Sensitivite Değerlerinin Hesaplanması

Araştırmada kullanılan testlerin spesifite ve sensitivite oranları Çizelge 3.3., Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Rapid test ve virus izolasyon testlerinin spesifite ve sensitivitesi.

		Virus İzolasyonu				
		+	-	Toplam	Spesifite	Sensitivite
Rapid Test	+	35	5	40	%91,5	%76
	-	10	66	76		
Toplam		45	71	116		

Çizelge 3.4. ELISA ve rapid testlerinin spesifite ve sensitivitesi.

		Rapid Test				
		+	-	Toplam	Spesifite	Sensitivite
ELISA	+	32	38	70	%50	%80
	-	8	38	46		
Toplam		40	76	116		

Çizelge 3.5. ELISA ve virus izolasyon testlerinin spesifite ve sensitivitesi.

		Virus İzolasyon				
		+	-	Toplam	Spesifite	Sensitivite
ELISA	+	32	38	70	%46,4	%71,1
	-	13	33	46		
Toplam		45	71	116		

3.3.2 Testlerin İstatistiksel Analizleri

Rapid test yönteminin CDV olgularını tespit edebilme oranı (sensitivite: duyarlılık) %76, sağlıklı hayvanların ayırt edebilme yeteneği (spesifite: özgüllük) %91,5, rapid test yönteminin genel olarak yeterliliği (testin geçerliliği) %85,3 olarak tespit edildi (Çizelge 3.3.).

ELISA test yönteminin CDV olgularını tespit edebilme oranı %80, sağlıklı hayvanların ayırt edebilme yeteneği %50, ELISA yönteminin genel olarak yeterliliği %60,34 olarak tespit edildi (Çizelge 3.4.).

Virus izolasyonu yönteminin CDV olgularını tespit edebilme oranı %71,1, sağlıklı hayvanların ayırt edebilme yeteneği %46,4, Virus izolasyon yönteminin genel olarak yeterliliği %38,7 olarak tespit edildi (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.6. Araştırmanın serolojik ve virolojik toplu sonuçları.

ÖRNEK NO	Rapid Test	IgG-ELISA	Virus İzolasyonu (CPE)
1	+	+	+
2	-	+	-
3	-	+	-
4	-	+	-
5	-	+	-
6	+	+	+
7	-	+	-
8	-	+	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	+	-
12	+	+	-
13	-	+	-
14	+	+	+
15	+	+	+
16	-	+	-
17	-	+	-
18	-	+	-
19	-	+	-
20	-	+	-
21	-	+	-
22	+	+	+
23	+	+	+
24	-	+	-
25	-	+	-
26	-	+	-
27	+	+	-
28	-	-	-
29	+	+	+
30	+	+	+
31	-	+	-
32	-	-	-
33	-	+	-
34	-	+	-
35	-	-	-

Çizelge 3.6 (Devam). Araştırmanın serolojik ve virolojik toplu sonuçları.

ÖRNEK NO	Rapid Test	IgG-ELISA	Virus İzolasyonu (CPE)
36	+	-	-
37	-	+	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	+	+	+
41	-	-	-
42	-	-	-
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	+
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	+	-
50	+	+	+
51	+	+	+
52	-	-	-
53	+	+	-
54	+	+	+
55	+	-	+
56	+	+	+
57	-	+	-
58	+	+	+
59	+	+	+
60	+	+	+
61	-	+	-
62	+	+	+
63	+	+	+
64	+	+	+
65	-	+	-
66	+	+	+
67	+	+	+
68	-	+	-
69	-	-	-
70	-	-	-
71	-	+	-
72	-	-	-

Çizelge 3.6 (Devam). Araştırmanın serolojik ve virolojik toplu sonuçları.

ÖRNEK NO	Rapid Test	IgG-ELISA	Virus İzolasyonu (CPE)
73	-	-	-
74	-	-	+
75	+	+	+
76	-	-	-
77	+	+	+
78	-	+	-
79	-	+	-
80	-	+	+
81	-	-	-
82	-	+	-
83	+	-	+
84	+	+	+
85	-	-	-
86	-	-	+
87	-	-	+
88	-	-	-
89	-	-	-
90	-	+	+
91	-	+	-
92	-	-	-
93	-	+	-
94	-	+	-
95	-	-	+
96	-	+	-
97	-	-	-
98	-	-	-
99	-	+	-
100	+	+	+
101	-	-	-
102	-	-	-
103	-	-	-
104	+	-	+
105	-	-	+
106	+	-	+
107	+	-	+
108	+	-	+
109	+	+	+

Çizelge 3.6 (Devam). Araştırmanın serolojik ve virolojik toplu sonuçları.

ÖRNEK NO	Rapid Test	IgG-ELISA	Virus İzolasyonu (CPE)
110	-	-	-
111	-	-	+
112	+	+	+
113	+	-	-
114	+	+	+
115	+	+	+
116	-	+	+

4.TARTIŞMA

Canine Distemper Virus enfeksiyonu, tüm dünya da birçok farklı karnivor türü için en önemli viral hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir. Enfeksiyon, yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip olup solunum, sindirim ya da merkezi sinir sistemi bulguları ile karakterize ağır bir klinik tablo oluşturur (Deem ve ark 2000). Ülkemizde köpeklerin evcil hayvan olarak evlere girmeye başladığı 1990'lı yıllardan itibaren canine distemper virus enfeksiyonu pet sahipleri ve veteriner hekimler tarafından daha fazla bilinir hale gelerek veteriner hekimlikte hastalıkla ilgili teşhis, tedavi, aşılama ve kontrol programları sıklıkla kullanılır hale gelmiştir.

Yavruların, aşılı anneden kolostrum yolu ile maternal antikor alımı 6 hafta sürdüğü ve erken dönemde aşılamanın immünosupresyon oluşturma gibi bazı dezavantajları olduğu dikkate alındığında, aşılama yavrulara 1,5-2 aylık dönemde başlanmalıdır. Virusa 0-6 yaşlarda, kolostrum ile CDV'ye karşı maternal Ab almamış ve aşısız hayvanlar daha duyarlıdır. Bu tür hayvanlarda hastalığın solunum ve sindirim formu daha yaygın şekilde seyretmektedir.

Canine Distemper Virusu aerosol yolla bulaşmaktadır (Harder ve Osterhaus 1997, Murphy ve ark 1999, Deem ve ark 2000, Hoskin 2010). Virus, sokaktan toplanan yavruların yoğun ve toplu olarak tutuldukları barınaklarda ve aynı kafes içerisinde tutulduğu satış yerlerinde daha sık görülmekte ve yayılması daha kolay olmaktadır. Sahna ve ark (2008) Kayseri barınağındaki 1-2 aylık köpek yavrularında yaptıkları çalışmada CDV, CPV ve CRV enfeksiyonun varlığını bildirmişlerdir. Bu değerlerin sırası ile %44,1, %76,5, %0, CDV ve CPV'un birlikte oluşturduğu enfeksiyon oranını ise %35,2 olarak rapor etmişlerdir.

Örnek toplanacak köpek seçimleri, bir dizi klinik muayene ve anamnez bilgilerinin toplanması neticesinde yapıldı. Barınaklarda, 0-12 aylık yavruların tutulduğu bölümler öncelikli olarak değerlendirildi. Hayvan hastanesi ve serbest kliniklerden elde edilen örnekler ise genelde 2-6 aylık, aşısız ve solunum sistemi klinik belirtileri gösteren köpek yavrularından alındı.

Bu araştırmada İndirekt ELISA ile incelenen 116 adet köpeğe ait kan serum örnekleri IgG yönünden değerlendirildi. Değerlendirme sonunda 70 örnekte (%60,34) CDV'ye karşı oluşan IgG Ab varlığı saptandı. Örneklerden 46 adeti ise (%39,65) CDV'ye karşı oluşan Ab varlığı yönünden negatif olarak kabul edildi. Serum örnekleri sadece IgG yönünden incelendiği için pozitif belirlenen hayvanların enfeksiyonu geçiriyor ya da geçirmiş olduklarını göstermektedir. Çalışmada kullanılan hayvanlara CDV yönünden aşı uygulaması yapılmamış olması elde edilen seropozitifliğin enfeksiyondan kaynaklandığını göstermektedir.

Bu çalışmada Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağından (21/116), Adana Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezinden (15/116) alınan toplam 36 köpeğin serum örneklerinden elde edilen seropozitiflik oranı % 58,3 (21/36) olarak belirlenmiştir. Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağında elde edilen oran %85,7 iken, Adana Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezinden elde edilen oran % 20 olarak bulundu. Adana bölgesindeki sonuçlardan elde edilen seropozitivite oranlarındaki bu farklılık Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma Hayvan Barınağında bulunan 0-12 yaş arası hayvanların bir arada tutulmasına bağlanmaktadır.

Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezinden (40/116) alınan köpeğin serum örneklerinden elde edilen seropozitivite oranı %70 (28/40) olarak belirlendi. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine (28/116) ve Konya'da bulunan serbest pet kliniklerine getirilen (12/116) toplam 40 adet köpeğin serum örneklerinden elde edilen seropozitivite oranı ise %52,2 (21/40) olarak belirlendi. Hayvan hastanesi ve pet kliniklerine getirilen hayvanlar ile barındırma merkezlerine bulunan hayvanlar arsında elde edilen seropozitivite oranlarındaki bu farklılık toplu yerde barındırılan hayvanların yakın temas yolu ile CDV enfeksiyonunu birbirine bulaştırması şeklinde açıklanabilir.

Kelly va ark (2005) Zimbabwe'de 4 farklı bölgede bulunan 173 adet aşısız hayvandan aldıkları kan serum örneklerini CDV'ye karşı gelişen Ab yönünden indirektt ELISA ile test etmişler ve %82 oranında seropozitivite belirlemişlerdir. En

yüksek seroprevalansı 2 yaşının altındaki köpeklerde tespit etmişlerdir. Afrika'da daha önce yapılan çalışmalarda %6 - 44 arasında değişen seropozitivite bildirilmiştir.

Von Messling ve ark (1999) 196 adet köpekten aldığı serum örneklerinin 123 adetini VNT ve indirektt ELISA ile pozitif olarak belirlemişlerdir. İndirekt ELISA ve VNT'lerinden elde edilen sonuçları karşılaştırmışlar ve bu testlerin birbirini destekler nitelikte olduğunu ortaya koymuşlardır.

Gemma ve ark (1995) doğal koşullar altında yaşayan 167 köpekten topladıkları kan serum örneklerini ELISA ile incelemiş ve 29 tanesinde yüksek Ab miktarı tespit etmişlerdir.

Gençay ve ark (2004) Ankara, Muğla ve İstanbul'dan topladıkları 609 adet klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerde CDV'ye karşı oluşan antikorları VNT ile %9,03 olarak tespit etmişlerdir.

Çalışkan ve Burgu (2007), CDV ön tanısı konulan 157 adet hayvanın kan serum örneklerini IgM ve IgG varlığı yönünden indirektt ELISA ile değerlendirmişlerdir. ELISA sonuçlarına ait değerlendirmede akut enfeksiyon varlığı gösteren IgM Ab, olguların %64'ünde, IgG Ab'ları ise %41'inde tespit edilmiştir. İndirekt ELISA sonuçları ile VNT sonuçlarının %80 oranında uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar (2007), indirektt ELISA ve VNT'lerinden elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olmasının bu testlerin birbirini destekler nitelikte olduğunu rapor etmişlerdir.

Türkiye'de bugüne kadar CDV ile ilgili yapılan serolojik çalışmalarda %9,03 (Gençay ve ark 2012) ve %41 oranında (Çalışkan ve Burgu 2007) seropozitiflik bildirilmiştir. Bu çalışmada Konya'da %61,2 ve Adana'da belirlenen %58,3'lük seropozitiflik oranı diğer araştırmalara göre daha yüksek tespit edildi. Bunun nedeni araştırmada CDV enfeksiyonuna ait klinik belirti gösteren köpeklerden örnekleme yapılmasına bağlanmıştır.

Bu çalışmada %20- %85,7 arasında değişen oranlarda CDV'ye karşı gelişen spesifik Ab varlığı yönünden seropozitiflik elde edildi. Belirlenen bu farklılık araştırmada örneklenen köpeklerin farklı bakım-besleme ve barındırma şartlarında yetiştirildiğini göstermekte olup bahsedilen şartların enfeksiyonun görülme sıklığını ne kadar etkilediğini ortaya koymaktadır. 0-12 aylık

Canine Distesper Virusu'nun üretilmesinde genellikle VERO ve MDCK hüre kültürleri kullanılmaktadır (Lednicky ve ark 2004). Lednicky ve ark (2004) yaptıkları çalışmada CDV'nin MDCK hücre kültürlerinde daha hızlı ürediğini fakat VERO hücre kültürlerinde daha belirgin CPE gözlediklerini bildirmişlerdir. Son yıllarda CDV'nin izolasyon çalışmalarında SLAM hücre reseptörlerine sahip VERO-DST hücre hatları kullanıldığı ifade edilmiştir (Seki ve ark 2003, Lan ve ark 2005b, Nakano ve ark 2009). Araştırmacılar, CDV suşlarının VERO ve VERO-DST hücre hatlarındaki üremelerini karşılaştırmış ve Vero-DST hücrelerinin, klinik örneklerden virus izolasyonunda oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Seki ve ark 2003).

Bu çalışmada uzun sürede üremesine rağmen, CDV'nin izolasyonu amacı ile daha belirgin CPE oluşturduğu için VERO hücre kültürleri tercih edilmiştir. 116 adet lökosit örneği VERO hücre kültürlerine inokule edilerek 5 kör pasajı yapıldı. Beşinci pasaj sonunda CPE yönünden 45 (%38,79) adet örnek pozitif olarak belirlendi. Bu 45 örneğin 35 tanesi aynı zamanda rapid test ile de uyumlu olarak pozitiflik gösterdi. Hem rapid testte pozitif olarak belirlenen hem de vero hücre kültüründe CPE pozitif tespit edilen 35 adet köpeğin CDV enfeksiyonuna yakalandıkları ortaya kondu. Örneklerin rapid test ile antijen varlığı yönünden pozitif belirlenmiş olması VERO hücre kültürlerinde elde edilen, hücre yuvarlaklaşması ve lizis ile karakterize CPE'lerin CDV'ye ait olabileceği şeklinde yorumlandı. Ag varlığı yönünden incelenen serum örnekleri ile hücreye ekilen lökosit örnekleri arasında benzer sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlar CDV'nin lökosit yanında serumda da olabileceğini ve CDV'nin Ag varlığı yönünden teşhisinde lökosit yerine kan serumun örneklerinin de tercih edilebileceğini ortaya koydu.

İmmunokromotografik bir yöntem olan rapid test, ekipman gerektirmeden kolayca uygulanabilirliği, ucuz olmaları ve güvenilir sonuçlar vermeleri nedeniyle son yıllarda veteriner hekimlikte bir çok viral hastalığın teşhisi için yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

An ve ark (2007) konjuktival, nasal svap ve kan örnekleri ile yaptıkları çalışmada, PCR ve Rapid testi karşılaştırmış, rapid testin sensivite ve spesifite oranlarını sırası ile konjuktival swap örneklerinde %100, nasal swap örneklerinde sırası ile %85,7 ve %100, kan örneklerinde ise %89,7 ve %94,6 olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada rapid testin sensivite ve spesifite oranları sırası ile %76 ve %91,5 olarak belirlenirken testin geçerliliği %85,3 olarak belirlendi. Bu veriler Ann ve ark (2007) yaptıkları çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Bu çalışmada rapid testte pozitif sonuç veren ve hücre kültüründe CPE görülen 35 adet örneğin, belirlenen CPE'leri CDV'ye ait olduğu düşünülmektedir. Buna karşın hücre kültüründe CPE görülen fakat rapid testte negatif sonuç veren 10 adet örneğe ait CPE'lerin CDV ile birlikte seyreden diğer viral enfeksiyonlara bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sahna ve ark (2008) Kayseri barınağındaki 1-2 aylık köpek yavrularında yaptıkları çalışmada CDV ve CPV'un birlikte oluşturduğu enfeksiyon oranını %35,2 olarak rapor etmişlerdir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar CDV enfeksiyonları ile yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlayacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

CDV şüpheli hayvanların laboratuvar teşhisi amacı ile alınacak örneklerin gold standart olan hücre kültürüne inokulasyonunu önermekteyiz. Ancak veteriner hekimliğin klinik uygulamalarında pratik, ucuz, kolay uygulanabilir ve kısa sürede sonuç verebilen rapid testler, yüksek spesifite ve sensitivite oranları ile CDV teşhisinde tercih edilebilir.

Fazla sayıda hayvanın bir arada tutulduğu barınaklarda, pet kliniklerde CDV'nin solunum formuna benzer semptomlar gösteren diğer solunum sistemi enfeksiyonları (*Bordetalla bronchiseptica, Klebsiella pnemoniae vb.)* ve sindirim formuna benzer semptomlar gösteren sindirim sistemi enfeksiyonları da (*Corona virus, Parvo virus, Escherichia coli vb.)* göz önünde bulundurulmalıdır.

Bundan sonraki CDV ile ilgili yapılması planlanan çalışmalarda IgG ile birlikte IgM yönünden de incelenmesi elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi açısından katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Dünyada vahşi hayvanlarda Morbillivirus enfeksiyonlarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak ülkemizde bu yönde fazla çalışma yapılmamıştır. Farklı il ve barınakların yanı sıra CDV'nin farklı türlerde de görülmesinden dolayı hayvanat bahçelerinde yetiştirilen vahşi hayvanların da dahil edileceği daha geniş araştırmaların yapılması önerilmektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Köpeklerde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Araştırılması

Ela ESİN

Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2013

Araştırmada Konya Büyükşehir Belediyesi Başıboş Hayvanları Koruma ve Barındırma Merkezi, Adana Büyükşehir Belediyesi Doğal Hayatı Koruma (DOHAYKO) Hayvan Barınağı'nda, Çukurova Belediyesi Sokak Hayvanları Rehabilitasyon Merkezi'nde bulunan, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine, Konya ve çevresinde bulunan serbest pet kliniklerine yüksek ateş, solunum, sindirim ve/veya sinir sistemi klinik semptomları ile getirilen, 0-12 aylık 116 adet köpek serum örneği CDV antijen varlığı yönünden rapid test ve antikor varlığı yönünden IgG ELISA ile incelendi. Aynı hayvanlara ait lökosit örnekleri VERO hücre kültürüne inokule edildi.

Rapid test ile incelenen 116 adet kan serumundan 40 adedi (%34,48), IgG-ELISA ile incelenen kan serumundan 70 adedi (%60,34) pozitif olarak belirlendi. VERO devamlı hücre kültürü inokulasyonunda 45 adedi (%38,79) CPE pozitif olarak değerlendirildi. Rapid test ile pozitif bulunan 35 adet (%30,17) örnek aynı zamanda VERO devamlı hücre kültüründe CPE gözlendi.

Bu sonuçlar CDV enfeksiyonunun köpekler arasında yaygın olarak görüldüğünü ortaya koydu.

Anahtar Sözcükler: CDV; Antikor; Antijen; Virus İzolasyonu; VERO.

7. SUMMARY

Investigation of Canine Distemper Virus Infection in Dogs

In the research, serum samples of 116 dogs between the ages of 0-12 months with clinical symptoms of high fever, respiratory, digestion and/or nervous system from Konya Metropolitan Municipality Protection of Stray Animals Center, Adana Metropolitan Municipality Society for the Protection of Natural Life Animal Shelter, Cukurova Municipality Center of Rehabilitation of Stray Animals, Animal Hospital in Selcuk University, Faculty of Veterinary Science and from private pet clinics in Konya District has been analyzed in terms of CDV antigen existence with Rapid Test and antibody existence with IgG ELISA test. Leukocyte samples from same animals have been inoculated to VERO permanent cell culture.

40 of the 116 blood serums tested with Rapid Test (34,48%) and 70 of the blood serums tested with IgG-ELISA (60,34%) gave positive results. 45 of the CPE (38,79%) has been evaluated as positive in VERO permanent cell culture inoculation. At the same time 35 of the positive resulted Rapid Test samples (30,17%) have been observed with CPE in VERO permanent cell culture.

These results prove that CDV infection is seen commonly among dogs.

Key Words: CDV; Antibody; Antigen; Virus Isolation; VERO.

8. KAYNAKLAR

1. Alldinger S, Baumgärtner W, van Moll P, Orvell C. In vivo and in vitro expression of canine distemper viral proteins in dogs and non-domestic carnivores. Arch Virol. 1993; 132: 421-8.

2. Alleman AR, Christopher MM, Steiner DA, Homer BL. Identification of intracytoplasmic inclusion bodies in mononuclear cells from the cerebrospinal fluid of a dog with canine distemper. Vet Pathol. 1992; 29: 84-5.

3. Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. Vet Res Commun. 2006a; 30: 679-87.

4. Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF. The nervous form of canine distemper. Vet Zootec. 2006b; 13: 125-136.

5. Amude AM, Carvalho GA, Alfieri AA, Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a matur dog with multifocal encephalomyelit. Braz J Microbiol. 2007; 38: 1-6.

6. Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF. Clinical courses and neurological signs of canine distemper in fection in dogs. In: Mendez-Vilas A, ed. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Spain, Formatex, 2010; 723-8.

7. An DJ, Kim TY, Song DS, Kang BK, Park BK. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. J Virol Methods. 2007; 147: 244-9.

8. Appel MJG. Canine distemper virus. In: Horzineck MC, ed. Virus infections of carnivores. Virus Infection of Vertebrates, vol.1. Amsterdam, Elsevier, 1987; 133-59.

9. Appel MJG, Summers BA. Canine distemper: Current Status. Recent Advances in Canine İnfectious Diseases. 1999; erişim tarihi:01.01.2013. Available from; [http://www.ivis.com.]

10. Avizeh R, Shapouri MR, Akhlaghi N. Antibody titers against canine distemper virus in unvaccinated rural dogs from Ahvaz, Iran. Pak J Biol Sci. 2007; 10: 3970-2.

11. Banyard AC, Rima BK, Barrett T. The morbilliviruses. In: Barrett T, Pastoret PP, Taylor W, ed. Rinderpest and Peste des petits ruminants. 1st edition, USA, Academic Pres, 2006. 13-30.

12. Baron MD, Barrett T. Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. J Virol. 2000; 74: 2603-11.

13. Barrett T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. Vet Microbiol. 1999; 69: 3-13.

14. Barrett T, Banyard AC, Diallo A. Molecular biology of the morbilliviruses. In: Barrett T, Pastoret PP, Taylor W. ed. Rinderpest and Peste des petits ruminants. 1st Edition, USA, Academic Pres, 2006. 31-67.

15. Baumgartner W, Boyce RW, Weisbrode SE, Aldinger S, Axthelm MK, Krakowka S. Histologic and immunocytochemical characterization of canine distemper-associated metaphyseal bone lesions in young dogs following experimental infection. Vet Pathol. 1995; 32: 702-9.

16. Bossart KN, Broder CC. Paramyxovirus Entry. In: Pöhlmann S, Simmons G, editors. Viral Entry into Host Cells. Austin, TX Landes Bioscience, 2009.

17. Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. Vet Immunol Immunopathol. 2009; 127: 1-18.

18. Bernard SL, Shen DT, Gorham JR. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. Am J Vet Res. 1982; 43: 2266-9.

19. Blancou J. Dog distemper: imported into Europe from South America. Hist Med Vet. 2004; 29: 35-41.

20. Blixenkrone-Møller M, Pedersen IR, Appel MJ, Griot C. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J Vet Diagn Invest. 1991; 3: 3-9.

21. Blixenkrone-Moller M, Bolt G, Gottschalck E, Kenter M. Comparative analysis of the gene encoding the nucleocapsid protein of dolphin morbillivirus reveals its distant evolutionary relationship to measles virus and ruminant morbilliviruses. J Gen Virol. 1994; 75: 2829-34.

22. Bolt G, Jensen TD, Gottschalck E, Arctander P, Appel MJ, Buckland R, Blixenkrone-Møller M. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. J Gen Virol. 1997; 78: 367-72.

23. Brown DD, Rima BK, Allen IV, Baron MD, Banyard AC, Barrett T, Duprex WP. Rational attenuation of a morbillivirus by modulating the activity of the RNA-dependent RNA polymerase. J Virol. 2005; 79: 14330-8.

24. Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. J Virol. 1993; 67: 4822-30.

25. Calderon MG, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. Vet Microbiol. 2007; 125: 341-9.

26. Campbell JJ, Cosby SL, Scott JK, Rima BK, Martin SJ, Appel M. A comparison of measles and canine distemper virus polypeptides. J Gen Virol. 1980; 48: 149-59.

27. Carpenter MA, Appel MJ, Roelke-Parker ME, Munson L, Hofer H, East M, O'Brien SJ. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. Vet Immunol Immunopathol. 1998; 65: 259-66

28. Carvalho OV, Botelho CV, Ferreira CG, Scherer PO, Soares-Martins JA, Almeida MR, Silva Junior AS. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. Adv Virol. 2012; 4: 1-10.

29. Chappuis G. Control of canine distemper. Vet Microbiol. 1995; 44: 351-8.

30. Curran MD, Rima BK. The genes encoding the phospho- and matrix proteins of phocine distemper virus. J Gen Virol. 1992; 73: 1587-91.

31. Çalışkan E, Burgu I. Köpek gençlik hastalığı virusunun prevalansı ve seroepidemiyolojisi. Vet Microbiol, 2007; 18: 5-10.

32. Damien BC, Martina BE, Losch S, Mossong J, Osterhaus AD, Muller CP. Prevalence of antibodies against canine distemper virus among red foxes in Luxembourg. J Wild Dis. 2002; 38: 856-9.

33. De Almeida DE, Roveratti C, Brito FL, Godoy GS, Duque JC, Bechara GH, Laus JL. Conjunctival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. Vet Ophthalmol. 2009; 12: 211-5.

34. De Vries P, Uytdehaag FG, Osterhaus AD.. Canine distemper virus (CDV) immune-stimulating complexes (Iscoms), but not measles virus iscoms, protect dogs against CDV infection. J Gen Virol. 1988; 69: 2071-83.

35. Deem SL, Spelman LH, Yates RA, Montali RJ. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. J Zoo Wildl Med. 2000; 31: 441-51.

36. Demeter Z, Palade EA, Rusvai M. Canine distemper: still a major concern in Central Europe. Medicina Veterinara 2009; 42: 136-50.

37. Di Guardo G, Marruchella G, Agrimi U, Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. J Vet Med. 2005; 52: 88-93.

38. Di Sciara GN. The Monachus Guardian. 2002; 5: 1-63. Erişim tarihi: 01.01.2013. Available from [http://www.monachus-guardian.org/mguard10/1001cont.htm].

39. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. J Virol Methods. 2006; 136: 171-6.

40. Engelhardt P, Wyder M, Zurbriggen A, Gröne A. Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro. Vet Microbiol. 2005; 107: 1-12.

41. Feliu-Pascual AL. Canine distemper encephalitis: The many faces of a diagnostic challange. NAVC Conference: 813-814. 2009, Barcelona-Spain.

42. Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3634-43.

43. Fukushima K, Helman RG. Cryptosporidiosis in a pup with distemper. Vet Pathol. 1984; 21: 247-8.

44. Gamiz-Mejia CE, Simon-Martinez J, Fajardo-Munoz RC. Identification of new genovariants of canine distemper virus in dogs from the State of Mexico by analyzing the nucleocapsid gene. Arch Med Vet. 2012; 44: 53-8.

45. Gemma T, Miyashita N, Shin YS, Okita M, Mori T, Iwatsuki K, Mikami T, Kai C. Serological survey of canine distemper virus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. J Vet Med Sci. 1995; 57: 761-3.

46. Gemma T, Iwatsuki K, Shin YS, Yoshida E, Kai C, Mikami T. Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. J Vet Med Sci. 1996; 58: 791-4.

47. Gençay A. Deniz memelilerinde morbillivirus enfeksiyonları. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2012; 9: 33-41.

48. Gençay A, Oncel T, Karaoğlu T, Sancak AA, Demir AB, Ozkul A. Antibody prevalence to canine distemper virus (CDV) in stray dogs in Turkey. Revue Med Vet. 2004; 155: 432-4.

49. Gillespie J, Baker J, Poppensiek G. Diarrhea in puppies caused by distemper virus. Ann N Y Acad Sci. 1956; 66: 204-9.

50. Gillespie J. The virus of canine distemper. Ann N Y Acad Sci. 1962; 101: 540-7.

51. Goldstein T, Mazet JA, Gill VA, Doroff AM, Burek KA, Hammond JA. Phocine distemper virus in northern sea otters in the Pacific Ocean, Alaska, USA. Emerg Infect Dis. 2009; 15: 925-7.

52. Gröne A, Engelhardt P, Zurbriggen A. Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. Vet Pathol. 2003; 40: 574-8.

53. Guo A, Lu C. Canine distemper virus causes apoptosis of Vero cells. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2000; 47: 183-90.

54. Guo L, Yang SL, Wang CD, Hou R, Chen SJ, Yang XN, Liu J, Pan HB, Hao ZX, Zhang ML, Cao SJ, Yan QG. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. Virol J. 2013; 10: 109.

55. Harder TC, Osterhaus AD. Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? Trends Microbiol. 1997; 5: 120-4.

56. Headley SA, Graca DL. Canine distemper. Epidemiological findings of 250 cases. Braz J Vet Res Anim Sci. 2000; 37: 1-9.

57. Higgins RJ, Krakowka S, Metzler AE, Koestner A. Canine distemper virus-associated cardiac necrosis in the dog. Vet Pathol. 1981; 18: 472-86.

58. Hoskins JD. Canine Viral Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Textbook of Veterinary İnternal Medicine: Disease of the Dog and Cat. 7th ed. Canada, Elsevier. 2010; 961-2.

59. Imhoff H. The role of lipid rafts in canine distemper virus infection. Ins of Virology, Universtiy of Veterinary Medicine Hannover. Doctor of Natural Sciences. 2006.

60. Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T, Kai C. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. Vet Microbiol. 2000; 71: 281-6.

61. Jones TC, Hunt RD, Kıng NW. Veterinary Pathology. Six edition. United States, Williams & Wilkins, 1997; 257-61.

62. Kang B, Oh J, Lee C, Park BK, Park Y, Hong K, Lee K, Cho B, Song D. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. J Virol Methods. 2007; 145: 30-6.

63. Kelly PJ, Musuka G, Eoghin GN, Tebje-Kelly JB, Carter S. Serosurvey for canine distemper virus exposure in dogs in communal lands in Zimbabwe. J S Afr Vet Assoc. 2005; 76: 104-6.

64. Kennedy S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. J Comp Path. 1998; 119: 201-25.

65. Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD, Deaville R, Forsyth M, Barrett T, Van de Bildt MW, Osterhaus AD, Eybatov T, Duck C, Kydyrmanov A, Mitrofanov I, Wilson S. Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 637-9.

66. Kim D, Jeoung SY, Ahn SJ, Lee JH, Pak SI, Kwon HM. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. J Vet Med Sci. 2006; 68: 877-9.

67. Kim YH, Cho KW, Youn HY, Yoo HS, Han HR. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. J Vet Sci. 2001; 2: 59-63.

68. Koutinas AF, Baumgärtner W, Tontis D, Polizopoulou Z, Saridomichelakis MN, Lekkas S. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard Pad disease) in dogs with natural canine distemper. Vet Pathol. 2004; 41: 2-9.

69. Kubo T, Kagawa Y, Taniyama H, Hasegawa A. Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus. J Vet Med Sci. 2007; 69: 527-9.

70. Lamb RA., Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Fields Virology, 3rd Edition, Philedelphia, Lippincott-Raven publishers, 1996; 1177-99.

71. Lan NT, Yamaguchi R, Furuya Y, Inomata A, Ngamkala S, Naganobu K, Kai K, Mochizuki M, Kobayashi Y, Uchida K, Tateyama S. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. Vet Microbiol. 2005a; 110: 197-207.

72. Lan NT, Yamaguchi R, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Growth profiles of recent canine distemper isolates on Vero cells expressing canine signalling lymphocyte activation molecule (SLAM). J Comp Pathol. 2005b; 133: 77-81.

73. Lan NT, Yamaguchi R, Nam NH, Kien TT. A canine distemper virus isolated from an autopsied dog in Hanoi, Vietnam. Journal of Science and Development. 2008; 70-4.

74. Latha D, Srinivasan SR, Thirunavukkarasu PS, Gunaselan L, Ramadass P, Narayanan RB. Assessment of canine distemper virus infection in vaccinated and unvaccinated dogs. Ind J Biotechnology. 2007a; 6: 35-40.

75. Latha D, Geetha M, Ramadass P, Narayanan RB. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. Vet Immunol Immunopathol. 2007b; 119: 278-86.

76. Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. J Virol Methods. 2004; 118: 147-57.

77. Lee MS, Tsai KJ, Chen LH, Chen CY, Liu YP, Chang CC, Lee SH, Hsu WL. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. Vet J. 2010; 183: 184-90.

78. Leisewitz AL, Carter A, van Vuuren M, van Blerk L. Canine distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of the literature. J S Afr Vet Assoc. 2001; 72: 127-36.

79. Maclachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's Veterinary Virology, 4th Edition, USA, Academic Pres, 2011; 299-320.

80. Maes RK, Wise AG, Fitzgerald SD, Ramudo A, Kline J, Vilnis A, Benson C. A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. J Vet Diagn Invest. 2003; 15: 213-20.

81. Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkrone-Moller M, Carmichael LE, Buonavoglia C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. Vet Microbiol. 2006; 116: 301-9.

82. Martella V, Elia G, Lucente MS, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkrone-Moller M, Lan NT . Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. Vet Microbiol. 2007; 122: 32-42.

83. Mayo MA, Pringle CR. Virus taxonomy-1997. J Gen Virol. 1998; 79: 649-57.

84. McCarthy AJ, Shaw MA, Goodman SJ. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. Proc Biol Sci. 2007; 274: 3165-74.

85. McIlhatton MA, Curran MD, Rima BK. Nucleotide sequence analysis of the large (L) genes of phocine distemper virus and canine distemper virus (corrected sequence). J Gen Virol. 1997; 78: 571-6.

86. Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. J Clin Microbiol. 1999; 37: 2936-42.

87. Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, Del Puerto HL, Vasconcelos AC. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2003; 50: 221-5.

88. Mosallanejad, B. Ghadiri, A. Avizeh, R. The possible relationship of megaesophagus and canine distemper in two German shepherd dogs. Iran J Vet Res. 2010; 11: 379-82.

89. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary Virology, 3rd Edition, USA, Acedemic Pres, 1999; 411-25.

90. Nakano H, Kameo Y, Andoh K, Ohno Y, Mochizuki M, Maeda K. Establishment of canine and feline cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule for canine distemper virus study. Vet Microbiol. 2009; 133: 179-83.

91. Nemo GJ, Cutchins EC. Effect of visible light on canine distemper virus. J Bacteriol. 1966; 91: 798-802.

92. Osterhaus AD, Vedder EJ. Identification of virus causing recent seal deaths. Nature. 1988; 335: 20.

93. Pardo ID. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected North American dogs. University of Missouri-Columbia, Master of Science Thesis, 2006.

94. Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5009-17.

95. Pardo MC, Tanner P, Bauman J, Silver K, Fischer L. Immunization of puppies in the presence of maternally derived antibodies against canine distemper virus. J Comp Pathol. 2007; 137: 72-5

96. Pomeroy LW, Bjornstad ON, Holmes EC. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. J Mol Evol. 2008; 66: 98-106.

97. Rikula UK. Canine distemper in Finland-vaccination and epidemiology. Academic Disertation University of Helsinki, Finland, 2008.

98. Rima BK. The proteins of morbilliviruses. J Gen Virol. 1983; 64: 1205-19.

99. Roscoe DE. Epizootiology of canine distemper in New Jersey raccoons. J Wildl Dis. 1993; 29: 390-5.

100. Rzezutka A, Mizak B. Sequence analysis of the fragment of the phosphoprotein gene of polish distemper virus isolates. Arch Virol. 2003; 148: 1623-631.

101. Sahna KC, Gençay A, Atalay O. Viral etilogy of diarrhoea in puppies from a same shelter in turkey: presence of mixed infections. Revue Med Vet. 2008; 159: 345-7.

102.Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negrão FJ, Morais HS, Alfieri AF. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Res Vet Sci. 2006; 80: 116-9.

103. Sato H, Masuda M, Miura R, Yoneda M, Kai C. Morbillivirus nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. Virology. 2006; 352: 121-30.

104. Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C. Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. Front Microbiol. 2012; 3: 75.

105. Scheid A, Choppin PW. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. Virology. 1977; 80: 54-66.

106. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. J Virol. 2003; 77: 9943-50.

107. Sheshberadaran H, Norrby E, McCullough KC, Carpenter WC, Orvell C. The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. J Gen Virol. 1986; 67: 1381-92.

108. Shin Y, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. J Vet Med Sci. 1995; 57: 439-45.

109. Shin YJ, Cho KO, Cho HS, Kang SK, Kim HJ, Kim YH, Park HS, Park NY. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. Aust Vet J. 2004; 82: 83-6.

110. Simons K, Garoff H. The budding mechanisms of enveloped animal viruses. J Gen Virol. 1980; 50: 1-21.

111. Simon-Martinez J, Ulloa-Arvizu R, Soriano VE, Fajardo R. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. Vet J. 2008; 175: 423-6.

112. Sips GJ, Chesik D, Glazenburg L, Wilschut J, De Keyser J, Wilczak N. Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. Rev Med Virol. 2007; 17: 223-44.

113. Stern LB, Greenberg M, Gershoni JM, Rozenblatt S. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. J Virol. 1995; 69: 1661-8.

114. Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandevelde M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. Vet Microbiol. 1997; 57: 83-93.

115. Stettler M, Zurbriggen A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. Vet Microbiol. 1995; 44: 211-7.

116. Sugai A, Kooriyama T, Sato H, Yoneda M, Kai C. Epitope mapping of Canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. Microbiol Immunol. 2009; 53: 667-74.

117. Terio KA, Craft ME. Canine distemper virus (CDV) in another big cat: should CDV be renamed carnivore distemper virus? MBio. 2013; 4: 702-13.

118. Turgut K, Ok M. Kedi ve köpek gastroenterolojisi. Konya, Bahçıvanlar Basım Sanayi. 2001; 311-19.

118. Vandevelde M. The pathogenesis of nervous distemper. 2004; Erişim tarihi: 01.01.2013. Available from; [http://www.vetscite.org/publish/articles/000052/print.html].

119. Vandevelde M, Zurbriggen A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. Acta Neuropathol. 2005; 109: 56-68.

121. Visser IK, van Bressem MF, Barrett T, Osterhaus AD. Morbillivirus infections in aquatic mammals. Vet Res. 1993a; 24: 169-78.

122. Visser IK, van der Heijden RW, van de Bildt MW, Kenter MJ, Orvell C, Osterhaus AD. Fusion protein gene nucleotide sequence similarities, shared antigenic sites and phylogenetic analysis suggest that phocid distemper virus type 2 and canine distemper virus belong to the same virus entity. J Gen Virol. 1993b; 74: 1989-94.

123. Von Messling V, Cattaneo R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. J Virol. 2002; 76: 4172-80.

124. Von Messling V, Harder TC, Moennig V, Rautenberg P, Nolte I, Haas L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1049-56.

125. Von Messling V, Milosevic D, Devaux P, Cattaneo R. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. J Virol. 2004; 78: 7894-903.

126. Von Messling V, Springfeld C, Devaux P, Cattaneo R. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. J Virol. 2003; 77: 12579-91.

127. Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. J Virol. 2001; 75: 6418-27.

128. Vural SA, Alcigir ME. Distemper virus-induced apoptotic changes in cerebellum. Ankara Univ Vet Fak Derg. 2010; 57: 83-86.

129. Williams ES. Canine Distemper. In: Williams ES, Barker IK, editors. Infectious Diseases of wild Mammals. 3rd edition. USA, Iowa State Univ. Press. 2001: 50-8.

130. Wohlsein P, Puff C, Kreutzer M, Siebert U, Baumgärtner W. Distemper in a dolphin. Emerg Infect Dis. 2007; 13: 1959-61.

131. Woma TY. The isolation and genetic charecterization of canine distemper viruses from domestic dogs (Canis familiaris) in South Africa. Universtiy of Pretoria South Africa, Faculty of Veterinary Science Thesis for the degree of Magister Scientie, 2008.

132. Yarım GF, Yağcı BB, Köpek gençlik hastalığı sinirsel formundaki köpeklerin plazmasında vitamin A ve beta-karoten düzeylerindeki değişiklikler. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2006; 53: 85-90.

133. Yoshida E, Iwatsuki K, Miyashita N, Gemma T, Kai C, Mikami T. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. Vet Microbiol. 1998; 59: 237-44.

134. Zarnke RL, Ver Hoef JM, DeLong RA. Serologic survey for selected disease agents in wolves (Canis lupus) from Alaska and the Yukon Territory, 1984-2000. J Wildl Dis. 2004; 40: 632-8.

135. Zurbriggen A, Graber HU, Wagner A, Vandevelde M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. J Virol. 1995; 69: 1678-86.

136. Zurbriggen A, Schmid I, Graber HU, Vandevelde M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. Acta Neuropathol. 1998; 95: 71-7.

9. EKLER

Ek. A: Etik Kurul Kararı Örneği:

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

Toplantı Tarihi	10.06.2009	Toplantı Sayısı	2009/11	Karar Sayısı	2009/052

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sibel YAVRU tarafından sunulan "**Köpeklerde Canine Distemper Virus Enfeksiyonunun Araştırılması**" isimli tez projesi yeniden değerlendirilmiştir.

Söz konusu projeye, projede görev alan doktora öğrencisi Ela ESİN'in deney hayvanı kullanım sertifikası bulunmaması, SÜVFEK yönergesinin 6.5 ve 12.6 maddesi uyarınca; *"deney hayvanı kullanım sertifikası olmayanların hayvan deneyleri yapmasının engellenmesi"* ve aynı yönergenin 8.2 maddesinde ifade edilen deney hayvanları üzerinde yürütülecek araştırmaların *"deney hayvanı kullanım sertifikalı ehil kişilerin denetiminde yapılmasına"* izin verilebileceğinin belirtilmesi; ayrıca SÜVFEK başvuru formunun araştırma taahhütnamesinde de *"Onay alınmış çalışmada; deney hayvanı kullanım sertifikası bulunmayan kişilere deney hayvanlarında herhangi bir işlem yaptırılmayacağı"* ifadesinin yer alması nedeniyle onay verilmemiştir (Karar No:2009/44).

Proje yürütücüsü/tez danışmanı tarafından yapılan 2. başvuruda, proje takvimi düzenlenerek, araştırmanın başlama tarihinin 2010 Ocak ayı olarak belirlendiği, doktora tez öğrencisi Ela ESİN'in bu süre zarfında deney hayvanı kullanım sertifikası alacağı ve sadece Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne mali destek başvurusunda kullanılmak üzere yeniden etik kurul değerlendirmesi istenmektedir.

Sunulan proje başvurusunun, 31 Aralık 2009 tarihine kadar doktora tez öğrencisi Ela ESİN'in deney hayvanı kullanım sertifikası alması ve kurula sunmasından sonra hayvan çalışmalarının başlatılması, bu süre zarfında adı geçen tez kapsamında deney hayvanları üzerinde herhangi bir işlem başlatılmaması kaydıyla, sadece BAP Koordinatörlüğü'ne mali destek başvurusunda bulunmasının **"uygun olacağına"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet MADEN Başkan	Prof. Dr. Enver YAZAR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Sadettin TIRIDAMAZ Üye	TOPLANTIYA KATILMADI Prof. Dr. Sevim KARAASLAN Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi

Prof. Dr. Fatma İNAL Raportör Üye	Prof. Dr. Vahdettin ALTUNOK Üye	TOPLANTIYA KATILMADI N. Dilek TOKUŞ Sivil Üye

10. ÖZGEÇMİŞ

30.11.1980 tarihinde Antalya'da doğdu. İlköğrenimini Barbaros İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimini ise Metin Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında girmiş olduğu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 2004 yılında bitirdi. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi bünyesinde açılan araştırma görevliliği sınavını kazanarak, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Şuan Antalya Büyükşehir Belediyesi Hayvanat Bahçe'sinde görev yapmakta olup evlidir.