T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CANİNE PARVOVİRUS ENFEKSİYONLARININ TEŞHİSİNDE PCR, ELISA VE HIZLI TESTİN KARŞILAŞTIRILMASI

Irmak DİK

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CANİNE PARVOVİRUS ENFEKSİYONLARININ TEŞHİSİNDE PCR, ELISA VE HIZLI TESTİN KARŞILAŞTIRILMASI

Irmak DİK

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Atilla ŞİMŞEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğütarafından 14102001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ÖNSÖZ

Canine parvovirus, diğer viruslar ile karşılaştırıldığında yaklaşık kırk yıllık bir geçmişi ile nispeten yeni bir etken olarak karşımıza çıkmakla birlikte tüm dünyada yaygın bir dağılım göstermiş, yoğun aşılama programlarına rağmen köpeklerde morbidite ve mortalite açısından önemini kaybetmemiştir. Canine parvovirusların çevresel dirençlilik göstermeleri, hassas hayvanlarda virulenslerinin yükselme eğilimine sahip olması, aşılanmış hayvanlarda immun sistemden kaçabilme yetenekleri ve mutasyona yatkın kabiliyetleri köpek populasyonlarında devamlılıklarına yol açmaktadır. Bu durum, canine parvovirus enfeksiyonlarının hızla teşhis edilmelerinin ve buna paralel olarak çok kısa bir süre içinde enfeksiyonla ilgili önlemlerin alınmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile ishalli köpeklerde Canine parvovirus tip-2 (CPV-2) enfeksiyonlarının teşhisinde PCR, ELISA ve son yıllarda kullanıma sunulan hızlı test kitlerinin karşılaştırılması ve güvenirliklerinin belirlenmesi hedeflendi.

Bu çalışmanın yapılmasında ve doktora eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK'e, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Sibel YAVRU, Prof. Dr. Orhan YAPICI, Prof. Dr. Oya BULUT, Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan AVCI ve Arş. Gör. Kamil ATLI'ya, çalışmanın örneklerinin toplanmasında yardımcı olan Arş. Gör. Erdem GÜLERSOY'a, istatistik değerlendirmesindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Enver YAZAR'a, tez çalışmalarım süresince göstermiş olduğu ilgisi, anlayışı ve sabrı için sevgili eşim Arş. Gör. Dr. Burak DİK'e ve bu günlere gelmemde hem maddi hem de manevi emek ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, her daim bana güvenen annem Raziye ÇAYLI, babam Himmet ÇAYLI ve abim Mehmet İlker ÇAYLI'ya sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR v

1.GİRİŞ 1

1.1. Genel Bilgiler 1

1.2. Etiyoloji 2

1.2.1. Sınıflandırma 2

1.2.2. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler 4

1.2.3. Canine Parvovirus'un Kökeni ve Evrimi 5

1.3. Epidemiyoloji 8

1.4. Patogenez ve Patoloji 10

1.5. Klinik Bulgular 14

1.6. Teşhis 16

1.6.1. Klasik Teşhis Yöntemleri 18

1.6.2. Moleküler Teşhis Yöntemleri 21

1.6.3. Aşı ve Saha Suşunun Ayrılması 22

1.7. Patolojik Bulgular 23

1.8. İmmunoloji 24

1.9. Koruma ve Kontrol 25

1.10.Tedavi 26

2. GEREÇ VE YÖNTEM 28

2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar 28

2.2. Dışkı Örneklerinin Hazırlanması 29

2.3. Hızlı Test 29

2.4. ELISA 30

2.5. Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu 31

2.6. PCR Uygulaması 33

2.7. PCR Ürünlerinin Elektroforezi 34

2.8. İstatistik Analizler 34

3.BULGULAR 35

3.1. Hızlı Test 35

3.2. ELISA 36
3.3. PCR 37
3.4. Teşhis Yöntemleri Arasındaki Farkın İstatistiksel Karşılaştırılması 39
3.5. Yaş ve Cinsiyetin Hastalık Üzerine Etkisinin İstatistiksel Karşılaştırılması 39
3.6. Teşhis Yöntemlerinin Spesifite ve Sensitivite Değerlerinin Karşılaştırılması 40
4.TARTIŞMA 41
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 53
6.KAYNAKLAR 54
7.EKLER 59
EK A: Etik Kurul Belgeleri 59
EK B: Tezden Üretilmiş Yayınlar 61
8. ÖZGEÇMİŞ 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bp	Base Pair
BCoV	Bovine Coronavirus
BRV	Bovine Rotavirus
CnMV	Canine Minute Virus
CPV	Canine Parvovirus
CPV-1	Canine Parvovirus Tip-1
CPV-2	Canine Parvovirus Tip-2
CrFK	Crendall Feline Kidney
dk	Dakika
$DKID_{50}$	Doku Kültürü İnfektif Doz $_{50}$
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzim Linked İmmunosorbent Assay
EM	Elektron Mikroskobu
EtBr	Ethidium Bromide
FAT	Floresan Antikor Testi
fg	Femtogram ($1fg=10^{-15}$ g)
FPV	Felin Panlökopeni Virus
g	Gram
HA	Hemaglutinasyon
HI	Hemaglutinasyon İnhibisyon
IC	İmmunokromatografi
Ig	İmmunglobulin
Kb	Kilobayt
LAMP	Loop- Mediated İsothermal Amplication
LAT	Latex Agglutination Test
µl	Mikrolitre
MAbs	Monoklonal Antikor
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEV	Mink Enterit Virus
mg	Miligram
NK	Negatif Kontrol

NS1/2	Parvovirus Yapısal Olmayan Proteinler
OD	Optical Density
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PK	Pozitif Kontrol
RFW	RNA Free Water
RNA	Ribo Nükleik Asit
RPV	Rakun Parvovirus
ssDNA	Single Straned Deoksiribo Nükleik asit
TAE	Tris Asetat – Ethylene Diamine Tetra Asetik Asit
VP1/2/3	Parvovirus Viral Kapsid Proteini

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Canine Parvovirus Enfeksiyonlarının Teşhisinde PCR, ELISA ve Hızlı Testin Karşılaştırılması

IRMAK DİK
Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA–2017

Tüm dünyada yer alan köpek popülasyonlarında yüksek mortaliteye sahip, bulaşma olasılığı oldukça fazla olan canine parvovirus tip 2 (CPV-2) enfeksiyonlarının kısa bir süre içinde, çabuk ve güvenilir bir biçimde teşhis edilebilmeleri önemli bir unsurdur. Bu araştırma ile klinik olarak gastroenteritis semptomları gösteren köpeklerde CPV-2 enfeksiyonlarının teşhisi için kullanılan polymerase chain reaction (PCR), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ve hızlı test yöntemlerinin duyarlılıklarının ve güvenilirliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Araştırmada CPV-2'ye karşı hiç aşılama yapılmamış, 0-12 aylık, farklı cinsiyet ve ırkta, ishal belirtilerine sahip toplam $^{10}0$ adet köpekten dışkı örnekleri alındı. Hayvanlardan elde edilen örnekler ticari ELISA ve hızlı test kiti ile protokollerine uygun olarak incelendi. Buna ilaveten her bir dışkı örneği CPV-2ab'nin VP-2 proteinini kodlayan gene spesifik primerler kullanılarak PCR testine tabi tutuldu. PCR testi ile 66 adet (%66), hızlı test ile 24 adet (%24), ELISA ile 16 adet (%16) örnekte CPV-2 yönünden pozitiflik belirlendi. Daha sonra, kullanılan testlerin duyarlılıkları (sensitivite) ve özgüllükleri (spesifite) hesaplandı. PCR yöntemi ile karşılaştırıldığı zaman hızlı testin duyarlılığı %36,36, ELISA'nın ise %24,24; her iki testin özgüllükleri ise %100 olarak tespit edildi. Bu üç testin sonuçları değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulundu ($p<0.05$). Bununla beraber yaş ve cinsiyetin hastalık üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Sonuç olarak CPV-2'nin teşhisinde ELISA ve hızlı testin duyarlılıklarının oldukça düşük seviyede olduğu saptandı. Bu nedenle ishalli köpeklerden elde edilen dışkılarda CPV-2'nin kesin teşhisinin yapılabilmesi için özellikle diğer teşhis yöntemleri ile negatif olarak belirlenen sonuçların PCR gibi moleküler temele dayalı yöntemlerle mutlaka doğrulanması gereklidir.

Anahtar Sözcükler: CPV-2; ELISA; hızlı test; PCR; teşhis

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Comparative Diagnosis of Canine Parvovirus with Methods of PCR, ELISA and Rapid Test

IRMAK DİK
Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2017

Early, quick and reliable detection of canine parvovirus type 2 (CPV-2) infections, highly contagious viral disease causing mortality in dog population all over the world, is very important. The aim of this study was to evaluate the differences among the polymerase chain reaction (PCR), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and rapid test methods that are used for CPV-2 diagnosis with clinical signs of gastroenteritis.

A total of 100 fecal samples were obtained from unvaccinated dogs with diarrhea, from newborns to 12 months old dogs, of both sexes. The collected fecal samples were analyzed by commercially antigen ELISA and rapid tests in accordance with standard procedures. In addition, each fecal specimen was subjected to PCR analysis using specific primers that amplify the gene coding of the VP-2 protein of CPV-2ab. Finally, the sensitivity and specificity of the tests were determined. Among the samples, 66 (66%), 24 (24%) and 16 (16%) samples were detected as positive for CPV-2 by PCR, rapid test and ELISA, respectively. The sensitivity of rapid test and ELISA were found to be 36.36% and 24.24%, respectively. Specificity of both tests was 100% when compared to the PCR technique. When the results of all three methods were evaluated, they were statistically significant ($p<0.05$). However, statistical analysis of the effect of age and sex on the test results revealed no significant difference ($p>0.05$).

In conclusion, the sensitivity of ELISA and rapid tests for diagnosis of CPV-2 infections is low. For this reason, negative results from other diagnostic tests should be confirmed by molecular-based methods, such as PCR, for definitive diagnosis of CPV-2 based on fecal samples from dogs with diarrhea.

Key Words: CPV-2; diagnosis; ELISA; PCR; rapid test

1.GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Canine parvovirus'un köpeklerden izole edilmiş iki tipi bulunmaktadır. Bunlar canine parvovirus tip 1 (CPV-1) ve canine parvovirus tip 2 (CPV-2)'dir. CPV-1'in ilk kez 1967 yılında köpeklerde hafif seyirli gastrointestinal ve respiratorik enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir. CPV-2 ise 1978 yılının ortalarında Amerika'da ortaya çıkmış daha sonra tüm dünyada yaygın olarak görülmüştür. CPV-2 köpekler arasında hızlı yayılma özelliği ve yüksek mortalite oranıyla isminden sıkça bahsettiren bir etken olarak kayıtlara geçmiştir. 1980'li yıllarda CPV-2'nin yeni bir suşu bulunmuş olup, bu suş CPV-2a olarak adlandırılmıştır. Ancak virus hızla mutasyona uğrayarak 1984 yılında CPV-2b suşuna dönüşmüştür. Günümüzde dünya çapında yaygın olarak görülen ve ölümlere neden olan CPV-2a ve CPV-2b' nin yanı sıra 2000 yılında İtalya'da yeni ve daha virülent bir suş olan CPV-2c tespit edilmiştir. (Binn ve ark 1970, Parrish ve ark 1991, Buonaoglia ve ark 2001).

Etken canine parvovirus tip 2 (CPV-2)'dir. *Parvoviridae* ailesi içerisinde yer alan, tek iplikçikli DNA (ssDNA) kapsayan oldukça küçük (18-26 nm) bir virustur. Birçok memelide hastalığa sebep olmalarının yanı sıra tür spesifiktirler. Evcil ve vahşi kedilerde hastalık yapan feline panlökopeni virus (FPV)'u ile köpeklerde hastalık yapan CPV-2 arasında amino asit dizilimleri açısından benzerlik bulunmaktadır. Ancak virusların türe spesifite göstermeleri ve monoklonal antikorlar sayesinde ayırt edilebilmeleri iki virusun birbirinden ayrımını sağlamaktadır (Goddard ve Leisewitz 2010).

Canine parvovirus'lar ısı ve birçok dezenfektana dayanıklıdır. Dışkıda yaklaşık olarak 4-7 hafta canlı kalabilirler. Virus çoğalmak için özellikle hızlı bölünen hücrelere ihtiyaç duymaktadır. Bağırsak kriptleri, kemik iliği ve lenfoid organlar CPV-2 replikasyonu için hedef dokular olmasına karşın, virus beyin dahil tüm dokulara affinite gösterebilmektedir. Akut enfekte köpekler virusu başta dışkıları ile olmak üzere, idrar, salya ve nazal akıntılarıyla virusu saçarlar. CPV-2'nin köpekler arasında hızla yayılmasında en etkili bulaşma yolu fekal-oral bulaşmadır. Akut enfeksiyon geçiren hayvanların, hastalıktan kurtulduktan sonraki haftalar hatta aylar sonra virusu yaymaya devam ettikleri bildirilmiştir (Nandi ve Kumar 2010).

Hastalık her yaşta görülmekle birlikte özellikle 12 aylıktan küçük köpeklerde şiddetli ve ölümcül enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Hastalığın akut hemorajik enterit ve miyokarditis olmak üzere iki klinik formu bulunmaktadır. Akut hemorajik enterit formu 12 aylığa kadar olan köpeklerde şiddetli hemorajik enterit, kusma ve depresyon semptomlarıyla kendini gösterebilirken, miyokardit formu ise fötal hayatta enfekte olan ve 8 haftalığa kadar olan yavrularda görülebilir. Miyokardit formunda hiçbir semptom oluşmaksızın, enfeksiyonu takiben 24 saat içerisinde ani ölümler ile karşılaşılabilir (Prittie ve ark 2004).

Canine parvovirus tip 2'de gözlenen klinik semptomlar, depresyon (laterji ve anoreksi), ateş, kusma ve mukoid ya da şiddetli hemorajik ishal ile birlikte seyreden ciddi enteritisler gözlenir. İshala bağlı dehidrasyon şekillenebilir. Enfeksiyonun teşhisinde; gözlenen klinik semptomlar, hayvanın yaşı ve hematolojik bulgular yardımcı olabilmektedir. Serolojik teşhis enzyme linked ımmunosorbent assay (ELISA), nötralizasyon ve hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri ile yapılırken, virolojik teşhis, elektron mikroskop, hızlı test, ELISA, hemaglutinasyon testi (HA), virus izolasyonu, polymerase chain reaction (PCR) ve real-time PCR testleri ile yapılabilmektedir (Pollock ve Goyne 1993, Desario ve ark 2005).

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Parvoviridae ailesi, *Parvovirinae* ve *Densovirinae* isimli iki alt aile içerir. *Parvovirinae* omurgalılarda enfeksiyona neden olurken *Densovirinae* insektlerde enfeksiyon meydana getirmektedir. *Parvovirinae* alt ailesi beş cinsten oluşur. Bunlar; 2013 yılına kadar *Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Amdovirus* ve *Bocavirus* olarak sınıflandırılmıştır (Decaro ve Buonavoglia 2012). Uzun yıllardır CPV-2 olarak bilinen etken, Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından Temmuz 2013 tarihinden itibaren *Parvoviridae* ailesi, *Parvovirinae* alt familyası, ***Protoparvovirus*** genusu içerisinde sınıflandırılmaya başlanmış, bununla eş zamanlı olarak *Parvovirinae* ailesi içerisinde bazı küçük değişiklikler yapılmıştır (Çizelge 1.1) (ICTV 2013, Cotmore ve ark 2014).

Çizelge1.1. Parvovirus sınıflandırması (ICTV 2013, Cotmore ve ark 2014).

Aile	*Parvoviridae*
Alt Aile	*Parvovirinae*
Genus	*Amdoparvovirus*
	Aveparvovirus
	Bocaparvovirus
	Copiparvovirus
	Dependoparvovirus
	Erythroparvovirus
	Protoparvovirus
Alt Aile	*Densovirinae*
Genus	*Ambidensovirus*
	Brevidensovirus
	Hepandensovirus
	Iteradensovirus
	Penstyldensovirus

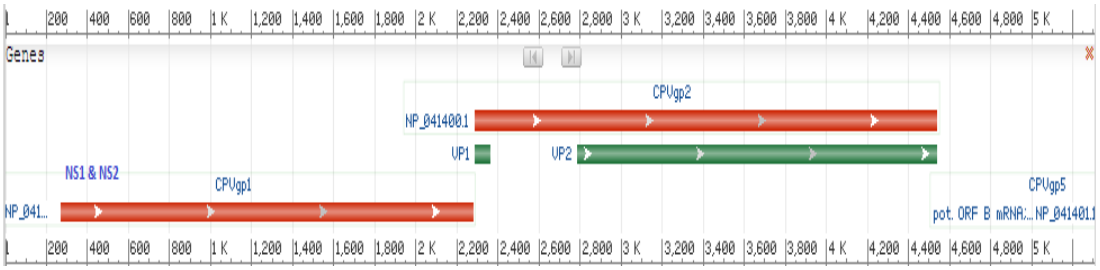
Parvovirus'lar çeşitli memelilerde hastalıklara sebep olabilmektedir. Parvovirus'lar genel olarak tür spesifiktir (Schoeman ve ark 2013). CPV-2; feline panleukopenia virus (FPV), mink enteritis virus (MEV) ve rakun parvovirus (RPV) ile birlikte *Parvoviridae* ailesi içerisinde yer almaktadır. Bir ila üç hafta arasındaki yavru köpeklerde görülen, hafif seyirli ishal, nefes darlığı ve anoreksi gibi belirtiler ile seyreden Bocavirus genusu içerisinde yer alan, CPV-1 olarak bilinen canine minute virus (CnMV) genetik ve antijenik olarak CPV-2 ile ilişkili değildir (Decaro ve Buonavoglia 2012). CPV-2, FPV ve MEV ile yakın antijenik ilişki içerisindedir. FPV yaklaşık 100 yıldır tanınmaktadır, MEV ilk kez 1947 yılında tanımlanırken, CPV-2 hastalığı ise 1978 yılında yeni bir etken olarak kabul edilmiştir. MEV ve CPV-2'nin, kedilerdeki parvovirusun konakçıda meydana gelen bir dizi mutasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kedi, mink ve köpeklerde görülen parvovirus hastalıkları, özellikle lökopeni ve enterit oluşturmaları açısından oldukça benzerlik göstermektedir (Decaro ve Buonavoglia 2012).

Canine parvovirus tip 2, 1978 yılının başlarında, köpeklerin enterik bir patojeni olarak ortaya çıkan, küçük, zarsız, negatif polariteli, 5.2Kb uzunluğunda tek sarmallı bir DNA virusudur (Decaro ve ark 2007, Goddard ve Leisewitz 2010, Nandi ve Kumar 2010). İkosahedral simetriye sahip olan kapsid yaklaşık 26 nm'dir (Reed ve ark 1988). 'Parvo' latince küçük anlamına gelmektedir (Nandi ve Kumar 2010).

1.2.2. Yapısal ve Yapısal Olmayan Proteinler

Parvovirus'lar, omurgalıları ve insektleri enfekte eden küçük (25 nm çapında) ve zarsız viruslardır. Parvovirus virionu doğrusal tek sarmallı DNA molekülü içeren küresel bir kapsidden meydana gelir (Decaro ve ark 2007, Cotmore ve ark 2014).

Parvovirus'lar hem küçük hem de genetik olarak basit bir yapıya sahiptir. CPV genomu, iki büyük ORF (open reading frame) ve daha küçük veya eşit genler içerir. Yaklaşık olarak 5.200 nükleotid uzunluğunda olan, üç yapısal (VP1, VP2 ve VP3) ve iki yapısal olmayan proteinden (NS1 ve NS2) oluşur. Viral mRNA'ların alternatif bağlanması yoluyla oluşan tek sarmallı bir DNA virusudur (Reed ve ark 1988, Parrish 1999, Decaro ve Buonavoglia 2012). NS proteinler virus genomunun 3' ucuna yakın olan kısımdaki transkripsiyon ünitesinden, VP proteinleri ise 5' ucuna yakın kısımdaki transkripsiyon ünitesinden oluşmaktadır (Şekil 1.1.) (Reed ve ark 1988). X-ışını kristalografisi vasıtasıyla, parvovirus kapsidinin, VP1, VP2 ve VP3'ün bir kombinasyonunun 60 kopyası tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. VP1, VP2'nin tamamını ve ek olarak bir N-terminal bölgesini içerir. En önemli yapısal protein olan VP2, viral kapsidin %90'nı oluşturmaktadır. VP2 aynı zamanda konak çeşitliliği ve virus-konakçı etkileşimlerinin ana belirleyicisi olarak görev yapar, konakçı proteazlar tarafından, VP-2 proteininden köken alarak VP-3 proteini DNA'da kapsid kısmında 15 ila 20 amino asitten oluşmaktadır. 60 kapsid protein altbirimi, iç kısımda sekiz iplikcikli, antiparalel bir β-barrel alanı döngü ilaveleri ile iplikçikler arasında ikosahedral bir simetri meydana getirirler (Decaro ve Buonavoglia 2012).



Şekil 1.1. CPV-2'nin nükleotid dizilimi ve genom organizasyonu (Reed ve ark 1988, NCBI NC_001539.1).

Yapısal proteinlerin yanında virusun DNA'sı iki adet yapısal olmayan protein (NS1 ve NS2) kodlamaktadır. Yapısal olmayan proteinler içinde yalnızca NS1 proteini CPV için önemli olan proteindir. Viral proteinlerin üretiminde ve viral genom replikasyonunda NS1 gerekli bir faktördür (Wang ve ark 1998).

1.2.3. Canine Parvovirus'un Kökeni ve Evrimi

Köpeklerde hastalık yapabilen parvovirus ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde 1967 yılında, askeri köpeklerde solunum ile ilgili hastalıkların araştırılması sırasında Walter Reed hücre kültüründe yapılan bir çalışma sonucunda küçük (20–21 nm) ve enfekte hücrelerde virionlara rastlanması sonucunda bu etkenin parvovirus olabileceği düşünülmüş, gastrointestinal ve solunum yolu hastalıklarının bir nedeni olarak keşfedilmiştir. Köpeklerde tespit edilen bu virus CnMV olarak isimlendirilmiştir (Binn ve ark 1970, Järplid ve ark 1996, Goddard ve Leisewitz 2010). Daha sonra virusun ismi CPV-1 olarak değiştirilmiştir. İlk tespit edilen virus köpeklerde şiddetli olmayan gastroenterit ve solunum yolu problemlerine sebep olmuştur. Etken ile enfekte olan köpeklerin birçoğu klinik semptom göstermeden kendiliğinden iyileşmiş ya da asemptomatik olarak yaşamlarını sürdürmüşlerdir (Goddard ve Leisewitz 2010).

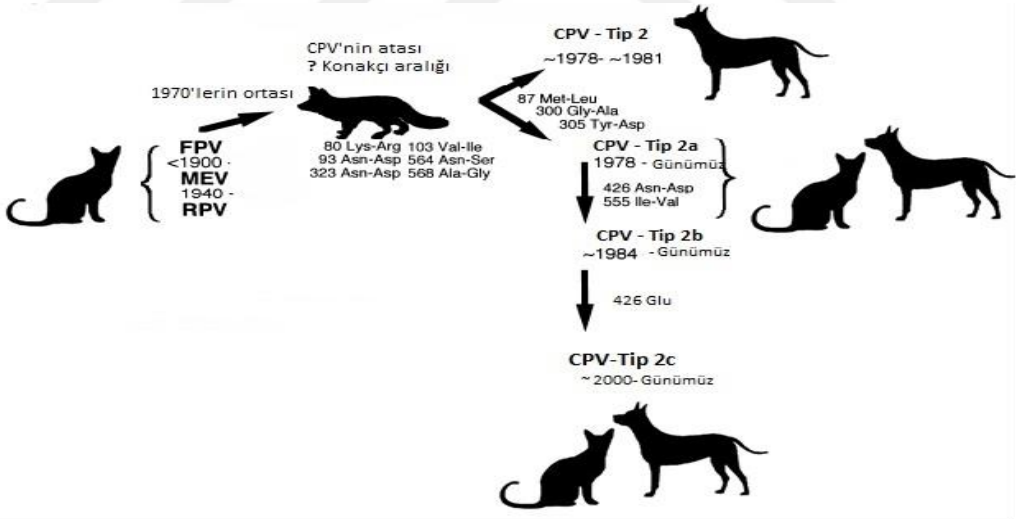
Köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip parvovirus enfeksiyonu, ilk kez 1978 yılının başlarında, Amerika, Avustralya, Yeni Zelanda, Asya ve Avrupa'da görülen yaklaşık olarak altı haftalık ve daha büyük olan köpeklerde kusma, ishal, yeni doğanlarda ise miyokarditislere neden olan bu etkenin daha önce köpeklerde görülen hastalıklardan farklı olduğu belirlenmiştir (Parrish 1999). Bu etken ile enfekte olan köpeklerden alınan dışkı ve doku örnekleri elektron mikroskop ile incelendiğinde küçük, yuvarlak ve zarsız bir virus olduğu tespit

edilmiş ve daha sonrasında köpek ve kedi doku kültürü hücrelerinden izole edilen bu yeni ve daha ölümcül virus CPV-2 olarak adlandırılmıştır (Schoeman ve ark 2013, Blanco ve Lopez 2015). CPV-2 aynı zamanda; katil virus, enfeksiyöz enterit virusu, bağırsak nezlesi virusu, yavru köpeklerin kalp virusu ve parvo olarak da isimlendirilmiştir (Martin ve ark 2002). Önceki virusa karşı oluşan bağışıklığın yeterli seviyede olmaması nedeniyle, bu virus hızla yayılmış ve 1980'li yıllarda dünya çapında salgınlara neden olmaya başlamıştır (Lamm ve Rezabek 2008). Geçmişte CPV-2'nin ani ortaya çıkışıyla ilgili çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. 1940'larda MEV ortaya çıkması için önerilen senaryoya benzer şekilde, uzun süredir bilinen FPV'nin mutasyona uğraması sonucu gelişmiş bir virus olabileceği bildirilmiştir (Pollock 1984, Truyen ve Parrish 1992, Parrish 1999, Truyen 1999, Goddard ve Leisewitz 2010). Bir diğer hipotez, doku kültüründe çoğalma sonrasında CPV'nin bir FPV aşısı virusundan ortaya çıktığı ve aşılarla yayılmış olabileceğidir. Bu durum, dünya çapındaki köpek populasyonlarında CPV'nin hemen hemen aynı anda ortaya çıkmasını açıklamaktadır. Üçüncü bir hipotez ise CPV'nin, kedi ya da köpekten farklı bir konakçıdan köken almış olma ihtimalidir. CnMV'nin vahşi karnivorlara bulaşması sonucu gelişmiş (mutasyona uğramış) yeni bir virus olabileceği düşünülmektedir (Truyen 1999).

Günümüzde, görünüşte farklı konak aralığı özelliklerinin virusların kapsid proteini tarafından belirlendiği ve bu farklılıklara yalnızca birkaç aminoasitin yol açtığı ve kritik genetik ve antijenik özelliklerden sorumlu olduğu bilinmektedir (Truyen 1999). CPV-1' in tersine CPV-2 ilk tespit edildiği andan itibaren yaklaşık 30 yıl içerisinde hızlı bir evrim geçirerek köpeklerde gelişen virus, kurt, tilki ve çakal gibi diğer vahşi karnivorlara bulaşarak onlarda da enfeksiyon meydana getirme yeteneği kazanmıştır (Steinel ve ark 2001). Ancak rakunların CPV-2 enfeksiyonuna dirençli oldukları gözlemlenmiştir (Nandi ve Kumar 2010). İlk yıllarda vahşi karnivorlar arasından hızla yayılan virus çok yüksek mortalite ile seyretmesine rağmen, aşının bulunmasıyla ölümler azalmış ve aşısız, düzgün aşılanmamış ve barınma şartları uygun olmayan populasyonlarda enfeksiyon sınırlandırılmıştır (Goddard ve Leisewitz 2010).

Virusun hızlı mutasyona uğraması sonucunda 1980'li yılların başında CPV-2'nin yeni bir suşu keşfedilmiş ve CPV-2a olarak adlandırılmıştır. Virus bu aşamadan sonra hızlı bir şekilde mutasyona devam etmiş ve 1984 yılında yeni bir suş

olan CPV-2b belirlenmiştir (Parrish ve ark 1988a). Günümüzde CPV-2a ve CPV-2b köpeklerde enfeksiyona neden olan en yaygın CPV-2 tipleridir (Decaro ve Buonavoglia 2012). 2000 yılında İtalya'da CPV-2'nin yeni bir suşu olan CPV-2c, Glu-426 (Asp-426→Glu)'ıncı amino asidin mutasyona uğraması sonucu CPV'nin üçüncü antijenik varyantı olarak tespit edilmiştir (Şekil 1.2). Bu yeni suş ilk olarak İtalya'da (Buonavoglia ve ark 2001), daha sonra sırasıyla Vietnam (Nakamura ve ark 2004), İspanya (Decaro ve ark 2006), Amerika Birleşik Devletleri (Hong ve ark 2007), Güney Amerika (Perez ve ark 2007), Portekiz (Vieira ve ark 2008), Almanya ve İngiltere' de (Decaro ve ark 2007) önemli salgınlara neden olmuştur. CPV-2'nin morbidite oranının çok yüksek olduğu ve ani ölümler ile seyrettiği bildirilmiştir (Martella ve ark 2004, Goddard ve Leisewitz 2010). Günümüzde antijenik varyantlar (CPV-2a, 2b ve 2c) tamamen orijinalin yerini almıştır (Decaro ve Buonavoglia 2012). Antijenik varyantlar ile orijinal CPV-2 arasındaki genetik farklılıklar zincir uzunluğunda ve 426'ncı pozisyonda CPV-2a (Asn), CPV-2b (Asp) ve CPV-2c (Glu)'de görülmektedir (Çizelge 1.2.) (Parrısh ve ark 1991, Martella ve ark 2006, Decaro ve Buonavoglia 2012).



Şekil.1.2. CPV'un Evrimi. CPV muhtemelen FPV benzeri bir virustan, tilki olması muhtemel bir yabani karnivordan köken almaktadır. Bu ata viruslardan orijinal CPV-2 virus türü ile CPV virusu soyları, 1970'lerin sonunda baskın bir virus olarak gelişmiştir. Bu tür yeni bir virus türü olan CPV-2a, CPV-2b ve 2000'li yıllardan sonra ise CPV-2c ile yer değiştirmiştir. Köpek ve kediler gibi geniş bir konakçı aralığında çoğalma fırsatı bulmuştur. (FPV: feline panleukopenia virus, MEV: mink enteritis virus, RPV: rakun parvovirus, CPV: canine parvovirus) (Truyen 1999).

Çizelge 1.2. FPV, CPV-2 ve CPV-2a/2b/2c enfeksiyonlarında VP-2 proteinindeki amino asit değişimleri (Steinel ve ark 2001, Decaro ve Buonavoglia 2012).

	Amino Asit (VP-2)									
	80	**87**	**93**	**103**	**300**	**305**	**323**	**426**	**564**	**568**
FPV	Lys	Met	Lys	Val	Ala	Asp	Asp	Asn	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ala	Ala	Asp	Asn	Asn	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Ala	Gly	Tyr	Asn	Glu	Ser	Gly

FPV ile CPV-2 arasında 6-7 aminoasitte farklılıklar bulunmakta ve bu farklılıklar VP-2 proteininde meydana gelmektedir (Decaro ve Buonavoglia 2012). Bu durum VP-2 sekansında FPV, CPV-2 ve CPV-2a/b arasındaki önemli biyolojik ve antijenik değişikliklere sebep olmakta böylece konakçı değişimine neden olmaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda FPV sadece kedi kökenli hücrelerde çoğalabilirken CPV hem kedi hem de köpek hücre hatlarında çoğalabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda FPV ve CPV'nin her ikisi de kedi VP-2 domaini konak hücre transferin reseptörü (TfR)'ne bağlanabildiği ve bu reseptörü hücre enfeksiyonu için kullandıkları belirtilmiştir. FPV yanlızca kedi TfR ile bağlanabilirken, CPV-2 ve varyantları kedi ve köpek TfR reseptörlerine bağlanabildiği bildirilmiştir. CPV-2 kapsidleri, kedi ve köpek hücrelerine, CPV-2a veya CPV-2b kapsidlerinden daha yüksek seviyede bağlanmaktadır. Bu durum CPV-2'nin TfR ile farklı etkileşimler oluşturduğunu veya bu hücreler üzerindeki ilave reseptörlere bağlanabildiğini düşündürmektedir (Shackelton ve ark 2005, Palermo ve ark 2006).

1.3. Epidemiyoloji

Köpek parvovirus enfeksiyonu tüm dünyada evcil ve vahşi köpeklerde yaygın olarak görülen bir hastalıktır (Miranda ve Thompson 2016). Köpek barınakları, pet shoplar ve köpeklerin birarada barındırıldığı yerlerde görülme insidensi yüksektir (Nandi ve Kumar 2010). Akut CPV-2 enteritisi, her ırk, yaş ve cinsiyetteki köpeklerde görülebilir fakat 6 hafta ile 4 ay arasındaki yavruların bu enfeksiyona karşı daha duyarlı oldukları bildirilmektedir (Goddard ve Leisewitz 2010, Nandi ve Kumar 2010). Düşük vücut ağırlığının ölüm oranını artırdığı bildirilmiştir (Schoeman ve ark 2013). CPV yalnızca köpekleri etkilemekte, insanlara veya diğer türlere bulaşmamaktadır. Bir köpek hastalandıktan sonra ilk 4 günde hayatta kalırsa,

genellikle hızlı bir şekilde iyileşmektedir. Ancak, birçok köpek yavrusu da tıbbi müdahale yapılamadan ölmektedir. CPV hastalığını geçiren ya da bu hastalığa karşı aşılanan köpeklerde uzun süreli bağışıklık meydana gelmektedir. Yavru köpekler kolostrum aldığı sürece (hayatın ilk birkaç haftası boyunca), anneden aldığı maternal antikorlar tarafından enfeksiyona karşı korunur (annede CPV'ye spesifik antikorların olduğu varsayılarak). Bu tür yeni doğanlarda hastalık nadiren görülür. Bununla birlikte, parvovirus için maternal antikorun yarılanma ömrü yaklaşık 10 gündür. Maternal antikor titresinde meydana gelen düşüş yavruları enfeksiyona duyarlı hale getirmektedir (Goddard ve Leisewitz 2010). Enfekte olmuş tüm köpekler klinik belirtiler göstermeyebilirler, ancak enterik ateşin akut fazı sırasında virusu dışkı ile saçabilirler ve serum antikor titrelerinde önemli artışlar gösterebilirler (Nandi ve Kumar 2010).

CPV-2 enfeksiyonu sıklıkla yavru köpeklerde görülür. Yetişkin köpekler bu enfeksiyona daha dirençlidir. Bu durum spesifik bağışıklığın, aşılamanın ve daha önce geçirilmiş subklinik enfeksiyonların sonucu olarak kabul edilir. Son yıllarda CPV enfeksiyonu yetişkin köpeklerde de görülür hale gelmiştir. Yetişkin köpeklerde bildirilen çalışmalar çoğunlukla CPV-2c ile ilişkilidir (Decaro ve ark 2008, 2009). Yüksek ateş, hızlı solunum, kusma ve kanlı ishal bulguları ile lenfopeniye sahip 12 yaşındaki bir köpekte CPV-2c enfeksiyonu bildirilmişir (Decaro ve ark 2009).

Parvovirus enfeksiyonuna karşı yavruların duyarlı hale gelmesindeki faktörler, koruyucu bağışıklığın yetersizliği, bağırsak parazitleri, sağlıksız, kalabalık ve stresli çevre koşullarıdır (Goddard ve Leisewitz 2010, Kumar ve ark 2015). Rottweiler, Doberman Pinscher, American Pit Bull Terrier, Labrador Retriever ve Alman çoban köpeği gibi bazı ırkların CPV enteriti için yüksek risk taşıdığı bildirilmiştir. Cins duyarlılığının sebepleri bilinmemekle birlikte, Doberman pinscher ve Rottweiler'daki her iki ırktaki ortak atalarda, von Willebrand hastalığı (VWD) prevalansı yüksektir ve rottweilerda kalıtsal bağışıklık yetersizliği söz konusudur (Prittie 2004, Goddard ve Leisewitz 2010). Genetik bileşenlerin yanı sıra, ırk popülaritesi ve uygun olmayan ya da eksik aşılama protokolleri gibi diğer faktörler de hastalık riskini artırabilir. Altı aylıktan büyük köpeklerin cinsel olgunluğa erişmesiyle birlikte, yaz ve kış aylarında dişi ve erkek köpeklerin temaslarının artması sonucu CPV enfeksiyonun gelişme riski artmaktadır (Goddard ve Leisewitz 2010).

CPV-2'nin antijenik varyantlarının, ülkelerde görülme oranları farklıdır. CPV-2b'nin yaygınlığı, Brezilya (Pereira ve ark 2000), ABD (Parrish ve ark 1988a), Japonya (Hirasawa ve ark 1996), İsviçre (Truyen ve ark 2000) ve Güney Afrika (Steinel ve ark 1998) gibi çeşitli ülkelerdeki araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Fransa, Tayvan ve İtalya'da CPV-2a'nın yaygın antijenik tip olduğu bildirilirken (Chang ve ark 1992, Martella ve ark 2004), CPV-2a ile CPV-2b'nin İspanya'da (De Ybanez ve ark 1995) eşit oranda dağıldığı bulunmuştur. CPV-2c, Vietnam (Nakamura ve ark 2004), İspanya (Decaro ve ark 2006), Birleşik Krallık (Decaro ve ark 2007), Güney Amerika (Perez ve ark 2007, Aldaz ve ark 2013) ve Kuzey Amerika'da (Kapil ve ark 2007) da bulunmuştur.

1.4. Patogenez ve Patoloji

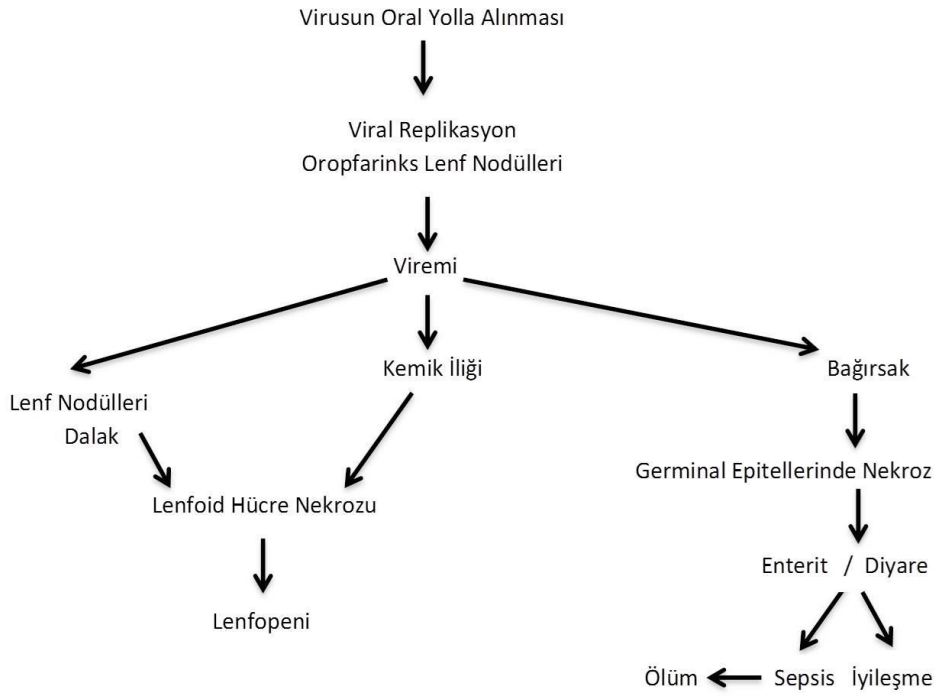
CPV-2 enfeksiyonu, enfeksiyöz virusun vücuda oral yol ile girmesi sonucunda oluşmaktadır. Minimum bulaşıcı doz bilinmemekle birlikte 100 doku kültürü enfektif doz kadar (100 $DKID_{50}$) çok düşük dozda olduğu düşünülmektedir. Enfekte hayvanların yoğun miktarda (dışkıda 10 milyar $DKID_{50}$/g kadar) etrafa virus saçmaları sonucunda 1970'lerin sonlarında tüm dünyada CPV enfeksiyonu çok hızlı bir şekilde yayılmıştır (Pollock ve Coyne 1993).

CPV-2'nin köpekler arasında hızla yayılmasında en etkili bulaşma yolu fekal oral bulaşmadır (direkt). Bir diğer bulaşma yolu ise dışkı ile kontamine olmuş maddelere maruz kalarak oronazal yol ile (indirekt) bulaşmadır. CPV-2 çok hızlı bir yayılma gücüne sahiptir (Goddard ve Leisewitz 2010). Parvoviruslar pH ve sıcaklık değişimleri, deterjanlar, susuz ortamlar ve solventlere karşı dirençlidir, bu sayede toz partikülleri ve kontamine malzemeler ile etkenler taşınarak enfeksiyon oluşturabilir. Şartlar uygunsa, CPV dışkı ile kontamine zeminde birkaç hafta veya daha fazla kalabilir. Hasta köpeklerle temas etmeyen sağlıklı köpeklerde de hastalığın oluştuğu görülmüştür. Bunun en önemli sebebi, köpek sahiplerinin ya da veteriner hekimlerin virusun bulaşmasında taşıyıcı rol almalarıdır (Goddard ve Leisewitz 2010). Vertikal bulaşma, CPV ve FPV enfeksiyonları için önemlidir. Fötal hayatta enfekte olan yavrular doğumdan sonraki bir veya iki gün içerisinde ölebilirler. Enfekte anne, virusun direk temas yoluyla da sağlıklı yavrulara bulaşmasına neden olabilir (Stuetzer ve Hartmann 2014).

Parvoviral DNA replikasyonu birçok yönden daha önce prokaryotik replikasyonları ile karakterize edilen, tek iplikçikli kolifajlar ve bazı bakteri plazmidlerindeki tek iplikçikli spesifik "Rolling circle" mekanizmalarını andırır. Viral parçacıklar ilk işlem olarak ikiye kopyalanan linear DNA genomunun tek bir kopyasını içerir. Viral DNA'da yer alan nispeten daha uzun olan tek iplikçikli kodlama bölgesi, saç tokası (Rolling hairpin) dubleks katlanabilen kısa (121-412 base) palindromik terminal sekanslar tarafından kesilir. Bu telomerler replikasyonda önemli rol oynarlar, replikasyon için gerekli bilgileri taşır ve farklı viral genlerde farklı şekillerde bulunmaları, yaşam döngüsünde birçok göreve sahip olabileceklerinin göstergesidir. Saç tokaları, internal bir baz'a sahip virion DNA'sının terminal 3' nükleotidini kullanarak konakçıya ait polymerazın ilk tamamlayıcı DNA iplikçiğini sentezlemesine izin veren bir DNA primeri oluştururlar (Cotmore ve Tattersall 1996).

Virus, hızlı çoğalma yeteneklerinden dolayı bağırsaktaki kript epitel hücrelerine, kemik iliği prekürsör hücrelerine, lenfoid doku hücrelerine ve kalp kası hücrelerine yüksek oranda affinite gösterebilir. Viral replikasyon, mitoz sırasında meydana gelen başarısızlığa bağlı olarak, hücre ölümlerine ve dolayısıyla hücresel kayıplara neden olabilmektedir (Smith-Carr ve ark 1997, Goddard ve Leisewitz 2010). Viral tropizim nedeniyle virus, hızlı mitoza sahip tüm hücrelerde aynı etkiye sahip değildir (Pollock 1984, Goddard ve Leisewitz 2010).

Parvovirus sadece mitoz bölünmenin S fazında bulunan konakçı hücrelerinde replike olabilir. Virusun alınması ile enfeksiyonun ilk iki gününde virus replikasyonu, orofarinks lenfoid dokularında, mezenterik lenf nodüllerinde ve timusta başlar daha sonra kemik iliği ve hassas bağırsak hücreleri (ince bağırsaktaki kript hücreleri) gibi hızla bölünen hücreleri içeren yeni organlara hematojen yolla (enfeksiyondan 3-4 gün sonra) dağılır, mitoz bölünmenin S fazındaki uygun reseptöre sahip hücreleri enfekte eder (Şekil 1.3.) (Cotmore ve Tattersall 1987, Pollock ve Coyne 1993, Goddard ve Leisewitz 2010, Nandi ve Kumar 2010). DNA'nın eşlendiği, kromatin sayısının iki katına çıktığı, protein sentezinin en yoğun olduğu ve sentrozomların eşleşmesi emrinin verildiği evre olması sebebi ile mitoz bölünmedeki S fazı parvovirus replikasyonu için önemlidir (Vermeulen ve ark 2003).



Şekil 1.3. CPV'nin Patogenezi (Pollock ve Coyne 1993).

Kemik iliğinde replike olan virus, bağışıklık sisteminin genç hücrelerinin tahrip edilmesinden ve daha sonra vücudun en iyi savunma mekanizmasını yok etmesinden sorumludur. CPV enfeksiyonları, kemik iliği enfeksiyonuna bağlı olarak beyaz kan hücre sayısında düşüş ile karakterizedir. Virus en yıkıcı tahribatını gastrointestinal sistemde oluşturur (Nandi ve Kumar 2010, Miranda ve Thompson 2016). Vireminin enfeksiyondan 1-5 gün sonra gözlemlendiği bildirilmiştir. Viremi aşamasından sonra, CPV-2 ağırlıklı olarak dil epitelleri üzerinde, ağız boşluğunda, özefagusda, ince bağırsakta, kemik iliğinde, timus ve lenf nodülleri gibi lenfoid dokularda lokalize olmaktadır. Ölen hayvanlardan yapılan nekropsi sonucu etken; akciğer, dalak, karaciğer, böbrekler ve myokarttan izole edilmiştir. Bu durum CPV enfeksiyonunun sistemik bir hastalık olduğunun ve kan yoluyla tüm vücuda yayıldığının en önemli göstergesi olarak bildirilmektedir (Goddard ve Leisewitz 2010).

Lenfoid ve intestinal hücrelerdeki yenilenme hızı hastalık şiddetini etkileyen ana faktörlerden biridir; hücre yenilenme hızı direk olarak virus replikasyonunun da artmasına ve böylece daha fazla hücrenin ölmesine neden olabilir. Stres faktörleri, intestinal parazitlerin varlığı ve sütten kesilme, bağırsaklarda mukozal hücre aktivitesini artıracağından yavruyu hastalığa karşı duyarlı hale getirebilir. Sütten

kesilme esnasında bağırsaklardaki bakteriyel florada ve diyette meydana gelen değişiklikler sonucu intestinal kriptlerdeki enterositlerin mitotik indeksi artabilir, böylece hızlı bölünen hücrelere karşı viral tropizm artar ve yavru hastalığa karşı duyarlı hale gelebilir (Meunier ve ark 1985, Goddard ve Leisewitz 2010).

Normal bağırsak, "villi" adı verilen küçük parmak benzeri çıkıntılara sahiptir. Bu küçük çıkıntılara sahip olmak, besinlerin ve sıvının emilimi için yüzey alanını arttırır. Ayrıca villuslar mikroskobik çıkıntılar olan "mikrovilli" ye sahiptirler (Nandi ve Kumar 2010). İnce bağırsaklarda olgunlaşan bağırsak kript epitel hücreleri, kriptlerin germinal epitelyumlarından villilerin uçlarına doğru göç ederler. Villus uçlarına ulaştıklarında, emici kabiliyet kazanırlar ve besinleri sindirmeye yardımcı olurlar. Parvovirus, bağırsak kriptlerinin germinal epitelyumlarını enfekte eder ve epitelyal hasara ve villusların bozulmasına neden olur. Sonuç olarak hücrelerin normal döngüsüne (genellikle ince bağırsakda 1-3 gün) zarar verir, kısalmış ve atrofiye olmuş villuslar gibi karakteristik patolojik lezyonlara yol açar. Villuslardaki atrofi döneminde ince bağırsak absorbsiyon kapasitesini kaybeder (Goddard ve Leisewitz 2010). Virus tarafından istila edilen kript epitellerinde dejenerasyon ve villöz atrofi şekillenir. Besinler absorbe edilemez bunun sonucunda ishal meydana gelir. Sindirim sisteminin koruyucu bariyeri bozulur. Kanlı ishal meydana gelir ve bağırsak bariyerinin kaybedilmesi, tüm vücudun potansiyel olarak bakteri istilasına izin verir, bakteriler vücuda girip yaygın enfeksiyona neden olabilir. Virus, ishal ve kusmaya bağlı olarak şok ve ölümle sonuçlanabilecek derecede aşırı sıvı kaybı ve dehidrasyona neden olabilir (Nandi ve Kumar 2010).

Hastalığa bağlı timusda meydana gelen değişiklikler dramatiktir. Lezyonlar sıklıkla germinal merkezde ve timik kortekste çok açık bir şekilde bulunmaktadır. Bu durum CPV'nin mitotik aktiviteye sahip hücre popülasyonlarına tropizmi olduğunu göstermektedir. Timusun (timik) korteksinde meydana gelen yaygın lenfositoliz, diğer lenfoid dokularla kıyaslandığında, timusun yüksek mitotik aktiviteli hücrelere sahip olduğunu yansıtır ve bu nedenle enfekte yavru köpeklerde ağır lenfopeni gelişmesi normaldir (Goddard ve Leisewitz 2010).

Hastalığın enterik formunda lezyonlar, gastrointestinal sistemde segmental olarak dağılabilir. Lezyonlar, genellikle jejunum ve ileumu etkilemesine karşın duodenum ve kolonu etkilemez. Etkilenen bölümlerde, subserozal hemoraji veya

konjesyon ile seyreder. Bağırsağın lumeni genellikle boştur. Mukozal yüzeyler genellikle hemorajik ancak eksudatsızdır. Mide mukozası konjesyone, kanamalı ya da safra ile boyanmış olarak görülebilmektedir. Mezenterik lenf düğümleri sıklıkla büyümüş ve ödematözdür. Hastalığın akut evresi boyunca lenf düğümlerinin korteksinde multifokal peteşiyal kanamalar sıklıkla görülür ve lökopeni oluşur. Genç köpeklerde timik korteks nekrozu ve atrofi belirgindir (Nandi ve Kumar 2010).

Histopatolojik incelemede lamina proprianın yıkımlanması, peyer plaklarında boşalma, bağırsak kriptlerinde epitel hücrelerin nekrozu, lamina propriada nötrofil granülosit ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile baskılanan ve nekrotik enterositleri içeren kript lümenlerinin şişmesi gibi parvoviral enteritis için patognomonik lezyonlar görülmektedir (Haligür ve ark 2009, Nandi ve Kumar 2010).

CPV, iki veya üç haftalık seronegatif köpek yavrularında, kalp hücrelerinde replike olarak ölümcül miyokarditlere sebep olabilmektedir. Çünkü neonatal hayvanlarda kalp kası hücreleri aktif bölünen hücrelerdir ve virus doğrudan kalp kası hücrelerine yerleşir. Parvoviral miyokardit, doğumdan hemen sonra yavruların etkene maruz kalmaları sonucu şekillenebilir. Bu yavrular CPV etkenine karşı kolostrum (CPV ye spesifik maternal antikor) almaları durumunda CPV'nin miyokardiyal formuna karşı korunabilirler (Pollock ve Coyne 1993). Parvoviral miyokardit vakalarında, lezyonlar, sol atriyum ve ön ventrikülde bulunur ve kardiyak genişleme mevcuttur. Trakea ve bronşlarda beyaz köpüklü eksudat bulunmasına karşın, akciğerlerde kollaps söz konusu değildir (Nandi ve Kumar 2010).

1.5. Klinik Bulgular

CPV-2, yetersiz maternal antikora sahip veya aşılanmamış köpekleri etkileyen çok tehlikeli ve bulaşıcı bir virustur. İlk keşfedildiğinde 1978 yılında, 5 aylık ve daha küçük yavru köpeklerin %2-3'ünün CPV'den öldüğü belirtilmektedir. CPV enfeksiyonu, sütten kesme zamanı ile 6 aylık arasındaki yavrular için en tehlikeli hastalık unsuru olarak kabul edilmektedir (Nandi ve Kumar 2010).

Hastalığın iki klinik formu vardır. Bunlar akut hemorajik enterit ve miyokarditis formlarıdır (Pollock ve Coyne 1993, Goddard ve Leisewitz 2010). Canine parvovirus tip 2'nin en karakteristik klinik tablosu hemorajik enteritistir ve

bu durum çoğunlukla CPV ile enfekte yavruların maternal antikor titrelerine bağlıdır. Anoreksi, depresyon, kusma, mukoid veya kanlı ishal, sıklıkla dehidrasyon ve ateş gibi klinik belirtiler virusun 3-7 gün inkübasyon periyodundan sonra oluşmaktadır. Eşzamanlı pulmoner enfeksiyonlar solunum sıkıntısının başlamasına neden olabilir. Yavrularda mortalite oranları yüksek (%70'e kadar) olabilir, ancak yetişkin köpeklerde genellikle %1'den azdır (Decaro ve Buonavoglia 2012). İshal her yaştaki köpekde ortaya çıkabilir, ancak yavru köpeklerde ciddi oranda yüksektir. Enteritisli köpekler aşırı acı çekiyormuş gibi davranırlar. Hastalığın erken belirtileri, depresyon, iştahsızlık, kusma, yüksek ateş ve şiddetli ishaldir. Hastalığın başlangıç aşamasında vücut ısısında hafif artış vardır. Dışkının belirgin karakteristik bir özelliği olmamakla birlikte, şiddetli olgularda sulu kıvamlı, açık sarı renkte ya da kanlı olabilir. Gastrointestinal sistem yoluyla yoğun sıvı ve protein kayıpları ciddi dehidrasyona neden olabilir, bunun sonucunda hipovolemik şok gelişebilir (Prittie 2004). Hızlı şekillenen dehidrasyon çok tehlikelidir. Köpeklerde genellikle semptomların başlamasından itibaren 3 gün içerisinde ölümle sonuçlanacak şiddette kusma ve ishal semptomları gözlenir. Hastalığın seyri ve klinik bulgular virusun enfeksiyoz dozuna bağlı olarak değişkendir, fakat klinik belirtiler genellikle enfeksiyondan 3-5 gün sonra ortaya çıkar ve ortalama 5-7 gün sürer. Morbidite ve mortalite oranları, hayvanların yaşlarına, bağışıklık durumlarına ve organizmada başka bir enfeksiyonun varlığına bağlı olarak değişebilmektedir. Yavru köpeklerde hastalığın ilk iki günü gibi erken bir zamanda şoka bağlı ölümler meydana gelebilir (Nandi ve Kumar 2010).

Canine parvovirus tip 2'nin diğer klinik formu, 3 aydan küçük yavruları etkileyebilen kalp sendromu veya miyokardittir. CPV-2 kökenli miyokarditisler ender olarak tanımlanır, çünkü enfeksiyona yakalanan yavrular klinik semptomlar gelişmeden veya klinik semptomlar ortaya çıktıktan kısa bir süre sonra ölürler. Miyokarditise bağlı kalp kasında multifokal nekroz, kas fibrillerinde yangılı ya da yangısız lizis gelişebilir ve kalp kası hücrelerinde intranükleer inklüzyon cisimciklerine rastlanabilir (Pollock ve Coyne 1993, Goddard ve Leisewitz 2010). Enfekte yavru köpeklerin 8 haftalıktan küçük yavruların %70'inde kalp defektine bağlı ölümler gözlenir, kalan %30'luk kısım patolojik değişiklikler gösterir ve bu durum aylar hatta yıllar sonra ölümle sonuçlanabilmektedir. CPV-2 miyokardit formunun en etkileyici semptomu 4 haftalıktan küçük yavrularda meydana gelen ani

ölümlerdir. Ölmek üzere olan yavrularda ekstremitelerde ısı kaybı, mukozalarda solgunluk ve solunum yetmezliği veya terminal konvülsiyonlar şekillenebilir. Solunum sıkıntısı ile akut kalp yetmezliği, 4-8 haftalık ve daha küçük yavrularda ortaya çıkar. Subakut kalp yetmezliği genellikle 8 hafta veya daha yaşlı yavrularda gelişir. Taşikardi oluşur, bazen aritmi ve zayıf bir nabız vardır. Çoğu yavru hayvan kardiyojenik şok yüzünden ölür. Bununla birlikte, eğer hayvan hayatta kalırsa, kronik miyokardiyal ve dolaşım komplikasyonları görülür. Hastalığın bu formunda virus kalpteki olgunlaşmamış kas hücrelerinde hızla çoğalır bu yüzden ishal gözlenmez (Nandi ve Kumar 2010).

1.6. Teşhis

Canine Parvovirus enfeksiyonu enterit, ateş ve lökopeni ile kendini gösterir. Hastalığın teşhisi alınacak iyi bir anamnez, klinik, laboratuvar ve histopatolojik bulgular, antijen tespiti için virolojik testler ve antikor tespiti için serolojik testler kullanılarak belirlenir (Pollock ve Coyne 1993, Goddard ve Leisewitz 2010). Canine parvoviral enteritlerinde oluşan semptomlar enfeksiyonun klinik teşhisine yardımcı olabilir. Özellikle aşısız yavrularda gelişen kusma, sulu veya kanlı ishal, devamında meydana gelen depresyon, dehidrasyon, ateş ve lökopeni gibi bulguların bir arada görülmesi teşhisin konulması yönünde yol gösterebilir (Pollock ve Coyne 1993, Goddard ve Leisewitz 2010).

Köpek kulubeleri ve barınaklarında, enfekte köpekleri izole etmek, duyarlı hayvanlarda sekonder enfeksiyonları önlemek ve bulaşma riskini azaltmak için CPV enfeksiyonunun hızlı bir şekilde teşhis edilmesi çok önemlidir. Klinik teşhis her zaman kesin sonuç vermeyebilir, köpeklerde coronavirus, adenovirus, morbillivirus, rotavirus ve norovirus gibi diğer viral patojenler de ishale neden olabilir. Bu nedenle şüpheli bir klinik vaka her zaman laboratuvar testleri ile teyit edilmelidir. CPV enfeksiyonunun laboratuvar tanısı için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ve genellikle köpeklerin dışkılarından (ya da hayvanın ölmesi halinde bağırsak içeriği) direkt teşhis ile gerçekleştirilebilir. Enfeksiyonun geç evrelerinde, EDTA-kan örneklerinin tanı için yararlı olduğu ispatlanmıştır, çünkü CPV'ye bağlı viremi son derece uzun sürelidir (Decaro ve Buonavoglia 2012). Şüpheli köpeklerin dışkılarında, ELISA, immünokromatografik (IC) veya hemaglutinasyon (HA) testleri kullanılarak teşhise gidilmeye çalışılır, ancak bu teknikler nispeten düşük duyarlılıklara sahiptir. Virus

izolasyonu, daha duyarlı bir yöntem olmasına karşın çok emek ve zaman alıcı bir teşhis metodu olduğu için rutin teşhisde çok tercih edilen bir yöntem değildir. PCR ile CPV-2 DNA'sının saptanması teşhis yöntemleri arasında oldukça duyarlı bir test olarak görülmektedir. Bu metod virus izolasyonuna göre daha kısa süre ve daha az emeğe ihtiyaç duymaktadır (Desario ve ark 2005).

Serolojik testler özellikle indirekt ELISA, CPV enfeksiyonunun tespit edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tipik olarak, CPV'ye karşı gelişen antikorlar, klinik bulguların başlangıcında saptanabilir hale gelir, antikor titresi hızla yükselir ve birkaç yıl boyunca yüksek kalır. Bununla birlikte sağlıklı aşılanmamış köpeklerin birçoğu önceki subklinik enfeksiyona bağlı olarak seropozitif olabileceğinden, aktif CPV enfeksiyonu için pozitif seroloji tek başına teşhis için yeterli değildir. Aktif CPV enfeksiyonunun serodiagnozu, tipik klinik bulgulara karşın IgM gibi anti-CPV antikorunun saptanmasını gerektirir. Akut gastroenterit semptomlu bir köpek yavrusunda bu tür anti-CPV antikorlarının olmaması, hastalık ajanı olarak CPV'yi ekarte etmek için genellikle yeterlidir. Ancak dışkıda antijen tespiti esasına dayanan testler daha yaygın olarak kullanılan teşhis yöntemleridir (Prittie 2004).

Teşhis amacıyla; hemaglutinasyon testi, elektron mikroskobi (EM), virus izolasyonu, ELISA, latex agglutination test (LAT), floresan antikor testi (FAT), virus nötralizasyon testi ayrıca PCR ve real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), nükleik asit hibridizasyon ya da dot blot, nükleik asit sekans analiz testleri kullanılır, fakat bu testler farklı sensitivite ve spesifite oranlarına sahiptirler ve bazen yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlar verebilirler (Nandi ve Kumar 2010, Decaro ve ark 2013).

Canine parvovirus enfeksiyonlarının tanısında hemotolojik, biyokimyasal ve endokrinolojik bazı diagnostik ve prognostik biomarker'lardan yararlanılmaktadır. Klinik olarak CPV enfeksiyonlarında kusma, lökopeni, lenfopeni, trombositopeni, koagulasyonun artması, hiperkortizolemi, hipoalbuminemi, hipokolesteolemi, artan C-reaktif protein ve tümör nekrozis faktör seviyesi gözlenmektedir (Schoeman ve ark 2013).

1.6.1. Klasik Teşhis Yöntemleri

Hemaglutinasyon testi, dışkıda CPV antijenini saptamak için basit ve hızlı bir testtir. HA testi için taze domuz eritrositleri gereklidir (Decaro ve ark 2013). Diğer türlerin eritrositleri, örneğin kedi veya rhesus maymun eritrositleri kullanılabilir, ancak bu eritrositlerin gerekli miktarda elde edilmesi zor veya pahalıdır. Bununla birlikte HA testinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için sonuçların eritrosit alınacak domuzun stres veya hastalık durumunda meydana gelebilecek eritrosit sedimantasyonunun değişmesinden etkilenebildiğinden, kaliteli eritrositlerin sağlanması güç olabilir. Ayrıca HA aktivitesine sahip olmayan CPV-2 suşları bildirilmiştir (Parrish ve ark 1988b, Decaro ve Buonavoglia 2012). Viral HA titresi hastalığın 4-7. günleri arasında veya enterit belirtileri başladığında yükselir. HA aktivitesi genellikle hastalığın 7-9. günleri arasında sona ermektedir (Nandi ve Kumar 2010).

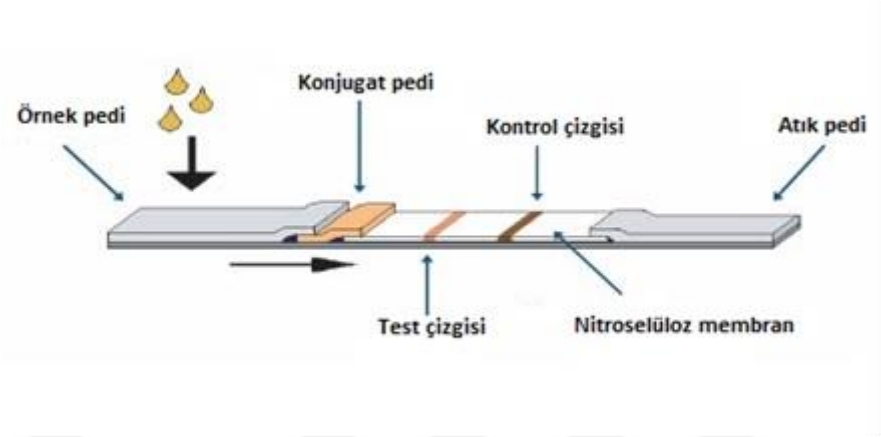
Canine parvovirus izolasyonu primer hücre kültürleri, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), Crandell Feline Kidney (CRFK) ya da A 72 gibi hücre hatları, CPV kaynaklı miyokardit ve enterit vakalarından izole edilen virusların çoğalmasını destekleyebilir. Ancak CPV'yi bu hücre hatlarına adapte etmek güçtür. Hücre kültürüne adapte edilmiş virus ile CPV'nin biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu sağlanabilmektedir. Bir köpek hücre hattı olan A-72 hücre hattı CPV-2'nin izolasyonu için özel bir yere sahiptir. Bu hattın, CPV'nin izolasyonu ve çoğalması için özellikle yararlı olduğu kanıtlanmıştır, çünkü CPV'ye bağlı oluşan cyto pathogenic effect (CPE) yapılan ilk pasajda ya da 2. pasajda görünür hale gelmektedir. A-72 hücre dizisi bir köpek S/C tümöründen elde edilmiş ve 135'den fazla seri pasajda fibroblastik bir görünüm sağlamıştır. A-72 hücreleri, karakterize olmayan tümör hücrelerinden köken aldığı için aşı virusu üretiminde kullanılmamalıdır (Nandi ve Kumar 2010). Virus izolasyonu hücre kültürlerinde yapıldığı için sadece laboratuvar ortamında hücre kültürü deneyimi olan personel eşliğinde yapılabilen bir teşhis yöntemidir. Bu yöntem zaman alıcı ve pahalı bir metottur (Decaro ve Buonavoglia 2012). HA ve virus izolasyonunun ana dezavantajı, enfekte olmuş köpeklerin bağırsak lümenindeki antikorlar ile virionların bağlanması ile hem HA hem de hücre reseptörlerine viral bağlanmanın önlenmesi sonucunda meydana gelen düşük hassasiyettir (Decaro ve Buonavoglia 2012).

Elektron mikroskop ile akut hastalık sırasında, parvoviral virionların negatif boyanması ile dışkılarda kolaylıkla CPV tespit edilebilir. Parvovirus morfolojisinin elektron mikroskop ile incelenmesi duyarlı bir teşhis yöntemi olarak bildirilmiştir (Nandi ve Kumar 2010). Viral antijenler bağırsak, beyin veya dil gibi organlardan gerçekleştirilen immünohistokimyasal yöntemlerle de tespit edilebilir (Decaro ve Buonavoglia 2012).

Antikor bazlı yöntemlerle viral antijenlerin tespit edilmesi temeline dayanan testler, veteriner hekimlik alanında CPV teşhisi için uygun ve kolay kullanılabilir yöntemlerdir. Bununla birlikte diğer geleneksel tanı yöntemleri gibi duyarlılıklarının, moleküler testlerden daha düşük olduğu kanıtlanmıştır (Decaro ve Buonavoglia 2012).

İmmunokromatografi tekniği hızlı sonuç veren ve kolay kullanıma sahip bir yöntem olduğundan son zamanlarda sık kullanılan bir teşhis yöntemidir. İmmunokromatografik test, hızlı test, kromatografik kart test, dip test, dipstik test, dipkart test, strip test, yanal akış testi gibi farklı isimler ile tanımlanabilmektedir. İngilizce olarak ise; “immunochromatographic (IC) test, lateral flow assay, lateral flow immunoassay, lateral flow sensor, lateral flow immunochromatographic test, point-of-care test, dipstick test, rapid test, immunoassay rapid test, rapid diagnostic test” gibi çeşitli isimlerle bilinmektedir. İmmünokromatografik testler, kapiller akım prensibine göre çalıştığı için genel olarak şerit yapısında üretilirler. Numune damlatma alanının hemen altında numune pedi bulunmaktadır ve eklenen numune öncelikle bu bölgede birikir. Şüpheli örnek, numune pedinin sıvı tutma kapasitesinden fazla damlatıldığından sıvı, numune pedine temas eden konjugatın bulunduğu pede doğru ilerler. Konjugasyon pedinin üzeri kapalıdır ve renkli moleküller burada bulunur. Konjugasyon pedine gelen sıvı numune buradaki moleküllerle reaksiyona girer ve buradaki molekülleri de sürükleyerek buna temas eden nitroselüloz membrana doğru ilerler. Nitroselüloz membranın başlangıç kısmı örtülüdür, test ve kontrol çizgisini içeren bölümünün üzeri ise açıktır; test sonucu buradan gözlemlenir. Nitroselüloz membranına ulaşan sıvı, içindeki molekülleri de sürükleyerek membran üzerinde kapiller akım kuvvetine göre membranın sonuna doğru ilerler. Bu sırada test çizgisi ve kontrol çizgisinde ilgili reaksiyonlar gerçekleşir ve buna göre test sonucunu gösteren renkli çizgiler oluşur. Sıvı daha da ilerleyerek membranın sonuna temas eden atık pedinde birikir, bu bölgenin de üzeri

kapalıdır (Şekil 1.4.). Bu reaksiyonların tamamı yaklaşık olarak birkaç dakika içinde gerçekleşir ve sonuç en fazla 5-10 dakika içinde değerlendirilebilir. Test sonucunu belirten çizgiler değişmeden kalır (Kaya ve ark 2014).



Şekil 1.4. Hızlı test kasetinin şematik görünümü.

Hızlı test (immunokromatografik test, IC), moleküler tekniklerle karşılaştırıldığında sensivitesinin, nükleik asit esaslı yöntemlere göre %50-70'i aşmadığını, buna karşılık spesifitenin %100 olduğu bildirilmiştir. Hızlı testin düşük sensivitenin nedeni olarak, enfeksiyonun ileri aşamaları sırasında bağırsak lümeninde viral antikor titrelerinin yüksek olmasına bağlı olarak dışkı ile virus saçılımının oldukça düşük düzeyde gerçekleşmesi gösterilmektedir (Desario ve ark 2005, Decaro ve Buonavoglia 2012).

ELISA, enzim ile işaretlenmiş konjugat ve enzim spesifik substrat kullanılarak, antijen-antikor reaksiyonlarının renk değişimi ile gözlenmesi ve bunun kantitatif olarak gösterilmesi sonucu şüpheli antijen veya antikor varlığı tespit edilmesini sağlayan bir teşhis yöntemidir (Çırak 1999). ELISA virusla enfekte yavruların dışkısında CPV-2'yi belirlemek için kolayca temin edilebilen bir teşhis yöntemidir (Prittie 2004). Bu test genellikle monoklonal antikorlar (MAbs) kullanılarak yapılan antijen-antikor reaksiyonuna bağlı bir teşhis yöntemidir. ELISA hızlı, nispeten ucuz ve kolay uygulanabilir bir testtir. Son zamanlarda dışkıda CPV antijeninin düşük miktarda tespiti için, monoklonal antikorların kullanıldığı bir ELISA testi bildirilmiştir. Çiftli sandviç ELISA, köpek dışkılarındaki CPV antijenin tespiti için rutin teşhis için kullanılan hızlı, basit, hassas ve uygun bir testtir. ELISA testi yavru köpeklerde parvovirus tespiti için yaygın olarak kullanılan testlerden biri

haline gelmiştir (Nandi ve Kumar 2010). Virus partikülleri, enfeksiyondan yaklaşık 3-12 gün sonra dışkı ile atılmaya başlar ve enfeksiyondan 4-7 gün sonra dışkı ile virus saçılımı en yüksek seviyeye ulaşır ve kolayca tespit edilebilir (Prittie 2004). Modifiye canlı CPV aşısı ile aşılanan köpeklerde 3-10 gün içerisinde dışkı ile aşı virusu atılabileceğinden yanlış-pozitif sonuçlar gözlenebilir. Enfeksiyondan sonra 10-12. günlerde nötralizan antikorlar ile antijenlerin bağlanması sonucu dışkı ile virus saçılımı azalacağından yanlış-negatif sonuç oluşabilir (Prittie 2004).

1.6.2. Moleküler Teşhis Yöntemleri

Moleküler teşhis yöntemleri genellikle konakçı bağışıklık tepkisinden etkilenmeyen, yoğun emek ve uzmanlığa ihtiyaç duyan yöntemlerdir. Nükleik asit hibridizasyon testi 1990'ların başından beri bilnmektedir. Daha sonra geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek sensitivite ve spesifite gösteren, dışkılarda parvovirus tespiti için kullanılan çeşitli testler geliştirilmiştir (Decaro ve Buonavoglia 2012). Bunlardan biri de PCR testidir. PCR ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından bilim dünyasına sunulmuş olup, günümüzde modern bilime önemli katkılar sağlayan moleküler teknolojideki önemli gelişmelerden bir tanesidir. PCR, ortamda gerekli enzim ve sentez için uygun mollekülerin bulunması durumunda, DNA veya RNA'nın özel bir dizisinin seçilip tanınması ve miktar olarak artırılması esasına dayanan bir yöntemdir (Sevindik ve Abacı 2013). PCR, basit ve hassas bir test olup, temelde üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada çift iplikli kalıp DNA molekülünün 90-95 ^{o}C ısı uygulanması ile denature olmasıdır (denatürasyon). Bu basamakta DNA tek iplikçikli hale gelir. İkinci aşama, 37- 60 ^{o}C sıcaklıklar arasında primerlerin tek iplikçikli DNA molekülüne bağlanma aşamasıdır (annealing=bağlanma). Üçüncü aşamada ise DNA zincirleri üzerine bağlanan primerler, DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla istenilen DNA bölgesi çoğaltılır (extension=uzama). DNA polimeraz enzimi ortalama olarak 72 ^{o}C sıcaklıkta en iyi çalışma performansı gösterdiği için çoğaltma basamağı bu sıcaklıkta yapılmaktadır. Birbiri ardına gerçekleşen bu üç basamak (denatürasyon, annealing, ekstension) bir PCR siklusunu temsil etmektedir. Genel olarak 25-40 siklus sonunda başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılmaktadır (Sevindik ve Abacı 2013). Şüpheli numunede bulunan az miktardaki CPV-2 etkeninin, HA ve ELISA gibi testler ile tespit edilemezken PCR ile tespit edildiği belirlenmiştir. PCR ile spesifik primerler kullanılarak CPV-2'nin farklı tiplerini ayırt

etmek mümkündür. Agaroz jel elektroforezinde yapılan geleneksel PCR ile dışkıda bulunan 10 fg kadar küçük miktar viral DNA'nın saptanabildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla PCR, dışkı örneklerinde CPV'nin saptanması için hassas, spesifik ve pratik bir yöntem gibi gözükmektedir. PCR testi, klasik yöntemlere göre daha az miktarda ki CPV partikülünü saptayabilir. Bu duyarlılık dışkıdan antijen tespiti için kullanılan hızlı test ve ELISA'larda ortaya çıkan yanlış negatif sonuçların sayısını azaltabilir. PCR ile yapılan teşhisler son derece spesifiktir ve aşı virusu ile saha viruslarını ayırt edebilir, böylece aşıya bağlı yalancı pozitif sonuçları engelleyebilir (Macintire ve Smith-Carr 1997, Nandi ve Kumar 2010).

Canine parvovirus DNA'sının hızlı, spesifik ve hassas algılanabilmesi için TaqMan teknolojisine dayanan real-time PCR testi geliştirilmiştir. Örneklerden CPV-2 DNA'sının saptanması için TaqMan sistemini kullanan real-time PCR, minor groove binder (MGB) prob teknolojisi ile viral türün hızlı ve net bir şekilde tanımlanması için uygulanmaktadır. MGB probları, komplementer DNA ile yüksek derecede stabilize dubleksler şekillendiren ve bu şekilde spesifiteyi artıran ve prob uzunluğunun azaltılmasına olanak sağlayan moleküller ile konjuge edilmiş kısa TaqMan problardır. Bu nedenle MGB probları, CPV 2a ile 2b ve CPV 2b ile 2c arasındaki kapsid proteini genlerindeki tek bir nükleotid polimorfizmini bile ortaya çıkarmaları açısından çok cazip materyaller olarak görülmektedir (Nandi ve Kumar 2010). Real-time PCR, konvansiyonel PCR'a kıyasla birçok avantaja sahip olup özellikle, agaroz jel elektroforezine ihtiyaç duyulmaması işgücünü azaltan bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Bütün veriler bilgisayar monitöründe grafik olarak gösterilmektedir. Bir başka avantaj da numunede bulunan DNA miktarının nicelleştirilebilmesidir ve birkaç numunenin aynı anda işlenmesine olanak tanımasıdır (Prittie 2004, Nandi ve Kumar 2010, Decaro ve Buonavoglia 2012). Bu avantajların yanı sıra cihaz ve prob maliyetlerinin yüksek olmasına bağlı olarak real-time PCR pahalı bir teşhis yöntemidir.

1.6.3. Aşı ve Saha Suşunun Ayrılması

Canine parvovirus aşısı ile aşılandıktan birkaç gün sonra köpeklerde meydana gelen ishal vakalarından alınan numunelerden teşhis yöntemleri uygulandığında yanlış sonuçlar elde edilebilir. Aşılar içerisinde bulunan modifiye virus konakçıya doğal olan oral yolla değil de intramuskuler ya da subkutan yolla girmesine karşın

düşük titrelerde dahi olsa da aşılanan köpeklerin bağırsak mukozasında çoğalabilir, doğal enfeksiyonlara göre daha kısa süre boyunca dışkı ile atılabilir. Böyle bir durumda, aşılanmış köpeklerin dışkılarındaki CPV-2 veya virus ait nükleik asidin saptanması geleneksel teşhis yöntemleri (ICT, HA, VI) kullanıldığında yanlış-pozitif sonuçlar sağlayarak, muhtemelen hastalığın yanlış teşhisine yol açabileceği göz önünde tutulmalıdır. Bu durumda PCR-RFLP ve sekans analizi gibi ileri tekniklerin kullanılması gerekebilir (Decaro ve Buonavoglia 2012).

1.7. Patolojik Bulgular

Parvovirus enfeksiyonlarında makroskobik olarak genellikle hayvanların gözlerinde çökme, deride elastikiyet kaybı ile karakterize dehidrasyon bulguları ve anal bölgenin sulu dışkı ile kirlenmiş olduğu gözlemlenir. Bunlarla birlikte parvoviral enteritlerde genellikle ileum ve jejunum bölgelerinde yaygın lezyonlar oluşur. Bağırsak mukozası konjestif ve belirgin bir biçimde ödemlidir. Bazı vakalarda ince bağırsaklar ve sekumda şiddetli kanamalar gözlenir. Bu kanamalar bazen yalnızca ileosekal bölgede çizgisel tarzda oluşabilir. İleum ve jejunum da serozal konjesyon ya da hemorajiler dikkati çeker. İleum ve sekum bölümlerinde Peyer plakları ödemli ve belirgindir. Peyer plaklarında özellikle nekroza bağlı hiperplazi belirgin bir bulgudur (Macintire ve Smith-Carr 1997, Tunca ve Toplu 2007). Bağırsak lümeninde dökülmüş epitelyal hücreler ve yangı hücreleri içeren kanlı sıvıya rastlanabilir (Vural ve Alçığır 2011). Mezenterik lenf yumruları büyümüştür, korteks kısmında kanamalar dikkati çeker. Timusta kortikal nekroz ve atrofi görülebilir (Macintire ve Smith-Carr 1997).

Parvoviral enteritle ilgili mikroskobik bulgular hızlı prolifere olan hücrelerde görülür. Bağırsaklarda meydana gelen erken lezyonlar kript epitellerinin nekrozudur. Kriptlerde dilatasyon, lamina propriyada mononükleer hücre infiltrasyonu, bağ doku artışı ve intranükleer inklüzyon cisimcikleri oluşmuştur. Hastalığın ilerleyen aşamasında bağırsaklardaki villiler körelmekte ve malabsorbsiyon/maldigesyon şekillenmektedir. Çok şiddetli vakalarda villiler tamamen nekroze olabilirler. Bu lezyonlar fokal olabileceği gibi bağırsakların segmentlerinde yer yer yaygın olarak da şekillenebilir. Çok şiddetli vakalar da dahil olmak üzere tüm vakalarda bağırsak hücrelerinde yenilenme görülebilir (Macintire ve Smith-Carr 1997). Lamina propriya ve submukoza katmanları arasında orta derecede proliferasyon görülebilir (Vural ve

Alçığır 2011). Bağırsak lenf nodüllerindeki, mezenterik lenf nodüllerinin germinal merkezlerindeki ve timusun korteksindeki lenfoid hücreler tükenmiştir. Akut vakalarda kemik iliğinde miyeloid ve eritroid hipoplazi şekillenebilir. İyileşme sırasında tüm lenfoid, miyeloid ve eritroid hücrelerde hiperplazi görülebilir (Macintire ve Smith-Carr 1997).

Parvovirus enfeksiyonlarında etkilenen diğer organ kalptir. Kalpteki bulgular genellikle aşısız anneden doğan, 8 haftalıktan küçük yavrularda meydana gelir. Nekropside kalpte büyüme, miyokardta solgunluk, miyofibrillerde azalma ve miyositlerde lizis görülebilir. Ventriküllerin endokardiyal veya epikardiyal yüzeylerinde beyaz bantlar veya fibroz çizgiler gözlemlenebilir. Neonatal enfeksiyonu atlatan daha yaşlı köpeklerin miyokardiyumunda incelme ve skar dokusu meydana gelebilmektedir (Bastianello 1981).

1.8. İmmunoloji

Canine parvovirus enfeksiyonuna karşı köpek yavrularının korunmasında karşılaşılan en büyük sorun, gelişen korunma mekanizmasının doğasından kaynaklanmaktadır. Yavrularda yaşamlarının ilk günlerinde annelerinden aldıkları kolostrum ile bağışıklık sağlanmaktadır. Hemaglutinasyon inhibisyon (HI) veya serum nötralizasyon antikor titreleri ile CPV enfeksiyonuna karşı gelişen direnç arasında pozitif bir korelasyon vardır. HI testi, bağışıklığı belirlemek için gerekli olan antikorlar miktarını belirlemede kullanışlı bir testir, 1:80 veya daha yüksek HI titresi koruyucu kabul edilirken 1:40 titresi, koruyucu değildir. Enfeksiyonun en yüksek görülme oranı, 6 haftalıktan büyük yavrularda bildirilmektedir. Köpeklerin diğer enfeksiyöz hastalıklarında olduğu gibi yavrular, yaşamın ilk haftasında kolostrum yoluyla edinilen maternal antikorlarla korunurlar. Aşı ile başarılı immunizasyon sadece seronegatif yavrular ya da çok düşük antikor titresine sahip yavrularda sağlanabilir. Maternal antikorlar yaşamın ilk 2-3 günü boyunca yüksek miktarlarda iken daha sonra azalmaya başlar, ortalama yarılanma ömrü 9-10 gün kadardır. Maternal antikorların koruma sağlamaya yetecek miktarda bulunmadığı kritik bir dönem bulunmaktadır. Ancak aşılanan popülasyondaki yavruların %90'ı, 12 haftalık iken yapılan aşılara cevap verir. Köpeklerin aşılanmasında genellikle canine distemper virus (CDV), CPV, leptospira ve inaktif kuduz virusu içeren karma aşılar kullanılmaktadır. Monovalan CPV-2 aşıları da bulunmakla birlikte, bunların bazıları

çok yüksek titrede virusu (100 $DKID_{50}$) içerir ve yavruların ilk aşılanması için yaygın olarak önerilir. Monovalen aşı ile 6 haftalık, tek doz aşılanan ve multivalen aşı ile 8 haftalık iken aşılanan tüm yavru köpeklerin yaklaşık %60'ında seropozitiflik meydana gelmiştir. 12 haftalıkken 2. ya da 3. rapeli yapılan yavru köpeklerin yaklaşık %10'unda seropozitiflik meydana gelmemiştir. İmmun yanıt oluşmamasının ana nedeni maternal antikor düzeylerinin devam etmesidir. Bu durum yapılan aşının yüksek ya da düşük titrede olmasına bağlı değildir. Bireysel aşılama takvimi 5-6 haftalıktan sonra yavru köpeklerden elde edilen maternal antikor titresinin belirlenmesi ile sağlanabilir. Maternal antikor titresinin 1/10'dan daha düşük olması, aşılama için doğru zamanı göstermektedir (Nandi ve Kumar 2010).

Orijinal tip-2 suşunu içeren CPV aşıları korumada oldukça etkilidirler. Bu suşu içeren aşıların günümüze kadar CPV tip 2a ve 2b saha suşlarına karşı, CPV-2 ve CPV-2b suşlarını içeren aşıların daha yeni bir suş olan CPV-2c de dahil olmak üzere CPV'nin bilinen tüm suşlarına karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Nandi ve Kumar 2010). Ancak CPV-2'nin yeni suşlara karşı tam olarak koruma sağlamadığı yönünde bilgiler de mevcuttur (Savi ve ark 2009).

1.9. Koruma ve Kontrol

Canine parvovirus enfeksiyonundan korunmada en önemli uygulama aşılamadır. İnaktif aşılar ile kısa süreli bağışıklık oluştuğundan modifiye canlı aşılar daha çok tercih edilmektedir. Canine parvovirus'a karşı çeşitli ticari aşılar bulunmaktadır, bunlar tek başına CPV içeren monovalan aşılar ya da CPV ile birlikte köpeklerde hastalığa neden olan çeşitli patojenlerin birlikte bulunduğu multivalan (karma) aşılardır. Bu monovalan ve multivalan aşılar seronegatif köpeklere uygulandığında etkilidirler. Ölü ve modifiye canlı aşılar hastalığa karşı yeterli koruma sağlamaktadır. Fakat ölü aşılar ile aşılanan köpeklerde, bağışıklığın geç oluşmasına bağlı olarak aşılamadan sonraki birkaç hafta içinde subklinik enfeksiyon şekillenebilmektedir. Bazı subklinik enfekte köpeklerin virusu diğer köpeklere bulaştırabildiği ifade edilmiştir (Pollock ve Coyne 1993).

Yavru köpeklerin aldıkları maternal antikorlar yaklaşık olarak 6-15 hafta koruyuculuk sağlamaktadır. Bu süre içerisinde saha suşuna maruz kalan yavru köpekler enfekte olmamakta ve enfeksiyona bağlı aktif bağışıklık oluşmamaktadır.

Yavruda meydana gelen koruyuculuk süresi annenin immun yanıtının enfeksiyona bağlı ya da yapılan aşının canlı ya da ölü olmasına bağlı olarak değişmektedir. Eğer yavru, anneden yeterli maternal antikor alamamışsa aşılama erken dönemde modifiye canlı aşılar ile yapılmalıdır. Maternal antikor alan yavru köpeklerde aşılamanın materal antikorun azaldığı kritik dönem olarak adlandırılan 9-14. haftalar arasında yapılmasının koruma için önem arz ettiği bildilmektedir (Pollock ve Coyne 1993).

Hastalıktan korunmada yavru köpeklerin hastalardan ayrılması ve özellikle enfekte köpeklerin dışkıladıkları yerlerden uzak tutulmaları gerekmektedir. Canine parvovirus zarlı bir virus olmadığı için dondurucu kış şartlarında ve çeşitli dezenfektanlar gibi zorlu çevre koşullarına karşı oldukça dayanıklıdır. Köpekler CPV ile enfekte olduktan sonraki iki hafta boyunca dışkıları ile yüksek miktarlarda etrafa virus saçarlar. Aşılanmamış bir köpek için ortalama bulaşıcı doz 1000 viral partiküldür. Enfekte bir köpek, dışkısının bir parçası ile 35.000.000 viral partikül (ortalama bulaşıcı dozun 35.000 katını) saçar. Kapalı bir ortamda virus 1 ay içinde bulaşıcılığını kaybeder, bu nedenle barınak ve kulübe gibi yerlerde aktif enfeksiyon sona erdikten 1 ay sonra yeni yavruların içeriye alınması güvenli olacaktır. Donmuş bir ortam, virus için tamamen koruyucu ve güvenli bir ortamdır. Eğer dış mekan kontamine ve donmuş ise yeni köpek yavruları için güvenli değildir. Ortamın çözdürülmesinden sonra iyice dezenfekte edildikten sonra yavrular buraya güvenle konulabilir. Güneş görmeyen gölgedeki alanlarda 7 ay, güneşli bölgelerde 5 ay enfekte kalabilen CPV dezenfektanlara karşı dayanıklı olmasına karşın 1/30 oranında hazırlanan klorlu çamaşır suyuna karşı dayanıklı değildir. Mekanik dekontaminasyon için pestisit mücadelesinde kullanılan püskürtme makinaları kullanılarak çevre potassium peroxymonosulfate ile iyice dezenfekte edilebilir (Nandi ve Kumar 2010).

1.10.Tedavi

Parvoviral enteritin tedavisi tamamen semptomatik ve destekleyici bir tedavidir. Bu tedavi kaybolan sıvı-eletrolit miktarını düzenlemek için sıvı-elektrolit takviyesi, kusmayı önlemek için antiemetik ilaçlar, sekonder enfeksiyonları önleyebilmek için antibiyotik, destekleyici amaçlı, vitamin, aminoasit ve enfeksiyonun şiddetini azaltmak için hiperimmun serum uygulaması şeklindedir (Macintire ve Carr 1997, Yılmaz ve Şentürk 2007). Doğru ve zamanında yapılan iyi

bir tedavinin hastalığın iyileşmesine önemli katkı sağlayacağı unutulmamalıdır (Macintire ve Carr 1997).

Tedavideki öncelikli amaç, kusma ve ishale bağlı oluşan sıvı-elektrolit kayıplarının giderilmesi olmalıdır (Goddard ve Leisewitz 2010). Bu amaçla kristalloid solüsyonlardan, sentetik veya doğal kolloidlerden yararlanılabilir. Dehidrasyonu gidermek amacıyla yapılan sıvı tedavisi, kan volümü ve sıvı-elektrolit dengesinin tekrar normal seviyeye dönmesini sağlayarak ve bunun yanı sıra şiddetli enfeksiyona sahip yavrularda, hayati önemi olan elektrolit kayıplarının yerine konmasına yardımcı olur (Macintire ve Smith-Carr 1997).

Tedavideki bir diğer amaç ise kusmanın engellenmesidir. Parvoviral enteritli köpeklerde kusmanın sebebi; intestinal kript epitellerinde meydana gelen hasar, anormal bağırsak motilitesi, kusma merkezini ve buradaki (trigger zone) kemo-reseptörleri uyaran ve aynı zamanda lokal irritasyona sebep olan endotoksin kökenli sitokin aktivasyonudur. Kalıcı ve uzun süreli kusmalara bağlı ciddi sıvı ve elektrolit kayıpları meydana gelirken, hasta hayvanın doğal yollarla beslenmesini ve oral yolla kullanılacak ilaçların emilimini de olumsuz yönde engellemektedir. Parvoviral enterit olaylarında metoklopramid, proklorpromazin ve ondansetron en sık kullanılan antiemetik ilaçlardır (Goddard ve Leisewitz 2010).

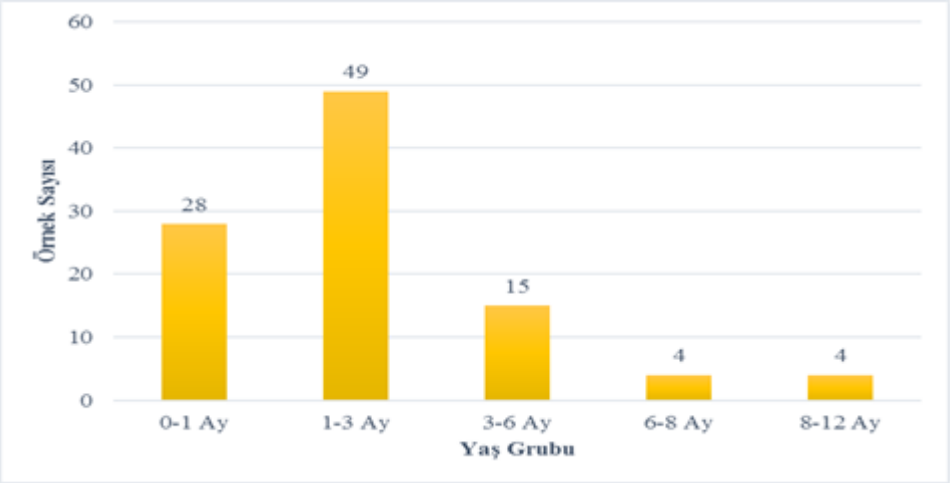
Günümüzde CPV-2 enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan PCR testi en güvenilir metot olarak karşımıza çıkmakla beraber pahalı, zaman alıcı ve uzmanlık gerektiren bir yöntemdir. Ancak son zamanlarda sahada çabuk ve pratik kullanıma sahip olduğu için tercih edilen hızlı kitler ve laboratuvar ortamında kısa bir süre içerisinde sonuçların değerlendirilmesine olanak sağlayan ticari ELISA kitlerinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Sunulan bu araştırmada tüm dünyada ve ülkemizde köpeklerde yaygın olarak görülen ve önemli kayıplara neden olabilen parvovirus enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan hızlı test, ELISA ve PCR yöntemlerinin birbirleriyle karşılaştırılarak güvenilirliklerinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

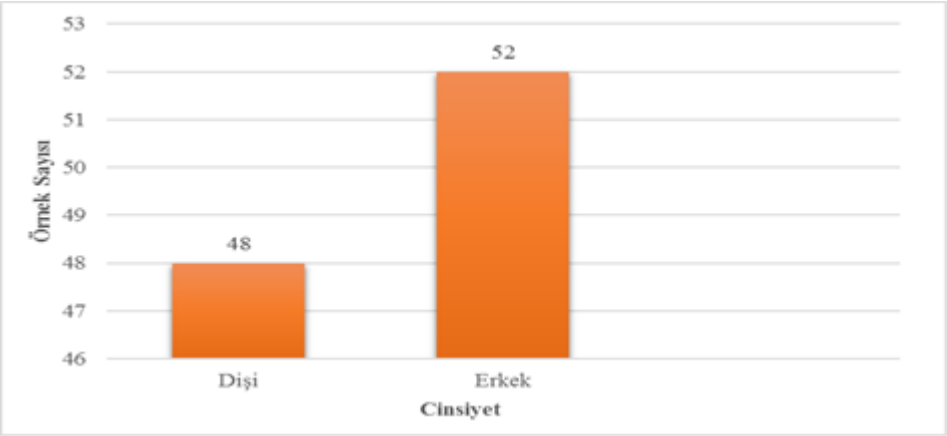
2.1. Araştırmada Kullanılan Hayvanlar

Bu çalışma için Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı kliniğine getirilen, klinik muayenede gastroenteritis semptomu gösteren ve parvovirus şüpheli 19 adet köpekten ve Konya Büyükşehir Belediyesi'ne bağlı hayvan barınağında bulunan, gastroenteritis semptomu gösteren 81 adet köpekten dışkı örnekleri toplandı. Örneklenen toplam 100 adet hayvan, CPV-2 aşısı uygulanmamış, 0-12 aylık farklı cinsiyetteki köpeklerden oluşmuştur.

Örneklemeler Ekim 2013 ile Ekim 2015 tarihleri arasında yapılmış olup örneklenen hayvanların yaş aralıkları ve cinsiyete göre dağılımları Şekil 2.1. ve Şekil 2.2.'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Örneklenen hayvanların yaş aralıkları.



Şekil 2.2. Örneklenen hayvanların cinsiyete göre dağılımları.

2.2. Dışkı Örneklerinin Hazırlanması

Canine Parvovirus enfeksiyonundan şüpheli ya da gastroenteritis semptomu gösteren toplam 100 adet köpekten alınan dışkı örnekleri laboratuvara getirildikten sonra PCR, ELISA ve hızlı test uygulamalarında kullanılmak üzere porsiyonlanarak steril üç ayrı ependorf tüpüne konuldu. Dışkı numuneleri testlerde kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C de saklandı.

2.3. Hızlı Test

Dışkı numunelerinde CPV antijenini tespit etmek amacıyla Biopronix-Agrolabo (İtalya) firmasına ait ticari hızlı test kiti kullanıldı.

Test kitinin içerisinde dışkı sulandırma sıvısı, damlalık ve test kaseti yer almaktadır. Ependorf tüplere paylaştırılan dışkı örnekleri, kite ait sulandırma sıvısı ile sulandırıldıktan sonra pipet yardımıyla alınıp test kitinde yer alan “S” yazılı kuyucuğa 3-4 damla kadar konuldu ve 5-10 dk beklendikten sonra oluşan çizgilere göre sonuç gözle okundu. Testin yorumlanması esnasında, kaset üzerindeki “C” yazılı bölümde tek bir çizginin oluşması kitin sağlıklı bir şekilde çalıştığını göstermekle birlikte test edilen dışkı örneğinin CPV antijeni yönünden negatif olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiş, kasetin hem “C” hem de “T” yazılı bölümünde birer çizginin oluşması ise sonucun pozitif olduğunun değerlendirilmesinde kriter olarak kullanılmıştır.

2.4. ELISA

Bölüm 2.2.1'de belirtilen şekilde önceden hazırlanan dışkı örnekleri, CPV'ye spesifik antijenlerin varlığı yönünden ticari olarak temin edilen direkt ELISA (Biopronix – Agrolabo, İtalya) kiti ile incelendi.

ELISA Kitinin İçeriği

Antikor ile kaplı 96 kuyucuklu mikropleyt,
Negatif kontrol,
Pozitif kontrol,
Konjugat I,
Konjugat II,
Substrat,
Stop solüsyonu,
25x Yıkama solüsyonu ve
Sulandırma solüsyonları içermektedir

ELISA Testinin Uygulanması

- Soğuk zincirde muhafaza edilen dışkı örneklerinin ve ELISA kitinin uygulamaya başlamadan 1 saat önce oda ısısına gelmesi sağlandı.
- 1/100 oranında sample ve konjugat-I diluent ile sulandırılarak hazırlanan pozitif (PK) ve negatif (NK) kontroller 100 µl olarak sırasıyla pleytin A1 ve B1 kuyucuklarına konuldu.
- Diğer kuyucuklara (C1, D1, E1 ……, vb) sulandırılan (1 gr dışkı 2 ml sample ve konjugat-I diluent ile karıştırılıp santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatant) dışkı örneklerinden 100 µl ilave edildi.
- 1 saat 37 ^{o}C'de inkubasyona bırakıldı. Hazırlanan yıkama solüsyonu ile 4 kez kuyucuklar yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 1/100 oranında hazırlanan konjugat-I'den 100'er µl ilave edildi. 1 saat 37 ^{o}C'de inkubasyona bırakıldı.
- 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Tüm kuyucuklara 1/100 oranında hazırlanan konjugat-II'den 100'er µl ilave edildi.

- 15 dk oda ısısında inkübe edildi. 4 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Tüm kuyucuklara substrat buffer ile 10 katlı sulandırılan substrattan 100'er µl ilave edildi ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklara, boşaltılmadan, 100 µl stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu.
- Mikropleytler sonuçlar değerlendirmek üzere ELISA okuyucusuna yerleştirildi.

Testin Değerlendirilmesi

Sonuçlar ELISA okuyucusunda (Rayta RT-2100C, Çin) 405 nm dalga boyunda okutularak Optik Dansite (OD) değerleri belirlendi ve sonuçlar kit prosedürüne göre değerlendirildi.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Kontroller kullanılarak testin "Cut Off" değeri hesaplandı;

Cut Off = $OD_{PK} \times 0.2$

Cut Off = $OD_{NK} \times 0.2$

Pozitif Örnek = Sample OD > PK Cut Off

Negatif Örnek = Sample OD > NK Cut Off

2.5. Dışkı Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemleri pozitif kontrol (CPV-2) ile birlikte yürütüldü. Toplanan dışkı örneklerinden 'QIAamp DNA Stool Mini Kit' (QIAGEN, 51504, Almanya) kullanılarak viral DNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu amaçla;

- 180-220 mg kadar dışkı örneği 2ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı,
- Herbir dışkı örneğinin üzerine 1.4 ml ASL buffer ilave edildi. Daha sonra dışkı örnekleri homojen dağılımın gerçekleşmesi için 1 dk boyunca vortekslendi.
- Süspansiyonlar 70 ^{o}C de 5dk ısıtıldı.
- Örnekler 15 saniye vortekslendikten sonra 1dk maksimum hızda (20.000 x g/ 14.000 rpm) santrifüj edildi.
- 2 ml'lik yeni santrifüj tüplerine 1.2 ml miktarında süpernatant alındı. Geriye kalan dışkı peletleri atıldı.
- Herbir örneğe 1 adet inhibitEx tablet ilave edildi ve hemen anında 1dk boyunca ya da tablet tamamen eriyene kadar vorteksleme işlemine devam edildi.

– İnhibitörlerin inhibitEx matrikse adsorbe olabilmesi için, süspansiyon 1dk boyunca inkübasyona bırakıldı.

– Örnekler maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi, (matrikse bağlanmış inhibitörleri çöktürmek için).

– 1.5 ml'lik yeni steril santrifüj tüplerinin içine süpernatantlar alındı ve peletler atıldı. Yeni tüplere alınan süpernatantlar maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi.

– Yeni 1.5 ml'lik tüplerin içine 15µl proteinase K ilave edildi.

– Proteinase K ilave ettiğimiz 1.5 ml'lik tüplere elde ettiğimiz supernatantlardan 200 µl eklendi.

– 200 µl AL buffer ilave edip 15 saniye vortekslendi.

– 70 ^{o}C de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

– Lizata 200 µl ethanol (%96-100) ilave edildi ve vortekslendi.

– 2ml'lik steril toplama tüplerine yerleştirilmiş spin collum tüpünün kapakları etiketlendi. Son adımda elde edilen lizat spin colluma dikkatlice konuldu. Kapak kapatılarak maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra spin collum tüpü yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Eski toplama tüpü atıldı.

– Spin collumun kapağı açılarak 500 µl buffer AW1 ilave edildi. Kapak kapatılarak maksimum hızda 1 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra spin collum yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Eski toplama tüpü atıldı.

– Spin collumun kapağı dikkatlice açılarak 500 µl buffer AW2 ilave edildi, kapak kapatılarak maksimum hızda 3 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü filtrat ile birlikte atıldı.

– Spin collum yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Yeni toplama tüpüne yerleştirilen spin collumu maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.

– Spin collum etiketlenmiş yeni 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Spin collumun kapağı dikkatlice açılarak içerisine 200 µl Buffer AE'i doğrudan QIAamp membranın üzerine ilave edildi. Kapağı kapatıp 1 dk oda ısısında inkübe ettikten sonra DNA elüsyonu için maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.

Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen DNA ekstraksiyon ürünleri PCR'da kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

2.6. PCR Uygulaması

Ekstraksiyonu yapılan örneklerden elde edilen viral DNA ürünleri ticari PCR kiti (Taq PCR Master Mix – QIAGEN, Almanya) kullanılarak incelendi.

İçerisinde master mix ve RNAse free su bulunan kit, kullanılıncaya kadar -20 ºC'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Araştırmada kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de belirtildi.

Çizelge 2.1. CPV-2ab'ye yönelik olarak kullanılan primer çifti dizilimi (Nandi ve ark 2010).

Primer	**Sekans (5' - 3')**	**Primer Genom Pozisyonu**	**Ürün Boyutu**
CPV-**2ab** (Forward)	GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATT	3025-3706	681bp
CPV-**2ab** (Reverse)	CCT ATA TAA CCA AAG TTA GTA		

Kit içerisinde bulunan Taq master mix ve RFW çözdürüldü. Kitin içerisinde belirtildiği gibi 10x 2µM lık primer çözeltisi hazırlandı. Herbir örnek için toplam miktar 100 µl olacak şekilde; DNA ürünü, hazırlanan primer çözelti, master mix solüsyonu ve RFW içeren ürün hazırlandı. Bu ürünler termal cycler (Bio-Rad T100, Singapur) içerisine yerleştirildi.

Termal cycler'daki PCR aşamaları ve bu aşamalar sırasında uygulanan derece (ºC)/ süre değerleri Çizelge 2.2.'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 2.2. PCR aşamaları ve bu aşamalar sırasında uygulanan derece (ºC)/ süre değerleri.

ADIM	**ZAMAN**	**ISI**	
1. Başlangıç Denatürasyonu	3 dakika	94 ºC	
2. Denatürasyon	45 saniye	94 ºC	35 siklus
3. Annealing (bağlanma)	45 saniye	50 ºC	
4. Extension (uzatma)	1 dakika	72 ºC	
5. Final Extension (son uzatma)	10 dakika	72 ºC	

2.7. PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Her bir PCR ürününün değerlendirilmesi için elektroforez tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla, %1.5'luk agaroz (Sigma, Almanya) 0,5xTAE (Tris Asetat – Ethylene Diamine Tetra Acetic Asid) tamponunun içerisine karıştırılarak mikrodalga fırında eritildi. 65–70 °C'ye kadar soğutulduktan sonra agarose jel içine 100 ml için 10 µl olacak şekilde Ethidium Bromide (EtBr-Sigma, Almanya) ilave edildi. Agaroz jel yatağı elektroforez tankına (Serva Electrophoresis GmBH, Heidelberg, Carl-Benz, Blue Marine 100, Almanya) yerleştirildi. Pozitif ve negatif kontrol dahil olmak üzere PCR ürünlerinin de (7 µl) bulunduğu DNase ve RNase free eppendorf tüplerine gel loading solution (Sigma, Almanya)'dan 3 µl konularak pipete edildi. Agaroz jeldeki ilk kuyucuğa 10 µl, 100 base pair (bp)'lik DNA Ladder (Solis BioDyne 100 bp DNA Ladder, Tartu Estonia), 2. kuyucuğa 10 µl pozitif kontrol, 3. kuyucuğa 10 µl negatif kontrol (PCR ürünü yerine RFW eklenerek hazırlandı) ve takiben sırasıyla PCR ürünlerinden 10'ar µl konuldu.

Elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağı (Serva, Blue Power Plus, Almanya) 100 V ve 50 mA ayarlandı ve 60 dk jelde katot (–)'dan anot (+)'a doğru numuneler yürütüldü. Bu süre sonunda jel transilluminatör (UVP Inc., Upland CA, ABD) altında incelenerek PCR sonrasında gelişen bantlar (681 bp) değerlendirildi ve fotoğrafları kaydedildi.

2.8. İstatistik Analizler

Araştırmanın sonucunda testlerden elde edilen veriler arasındaki sensitivite (duyarlılık; bir test metodu ile tespit edilebilen pozitiflerin o grupta yer alan toplam/gerçek pozitiflere oranı) ve spesifite (özgüllük; bir test metodu ile tespit edilebilen negatiflerin o grupta yer alan toplam/gerçek negatiflere oranı) değerleri Martin ve ark (1994) tarafından belirtilen metot ile hesaplandı. Araştırmada kullanılan teşhis metodlarının karşılaştırılması Mc Nemar Testi (SPSS istatistik programı, versiyon 22.0) ile değerlendirilirken, cinsiyet ve yaşın hastalık üzerine etkisi Ki-kare testi ile değerlendirildi (SPSS istatistik programı, versiyon 22.0). $P<0.05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

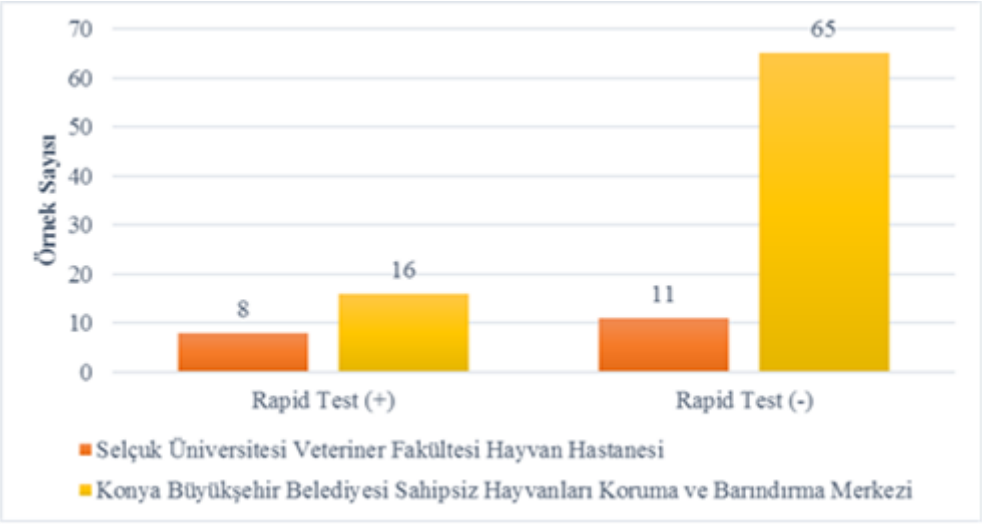
3.BULGULAR

3.1. Hızlı Test

Hızlı test ile incelenen 100 adet köpeğe ait dışkı örneklerinden 24 adedi (%24) CPV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken, 76 adedi (%76) negatif olarak belirlendi (Şekil3.1.). Hızlı test sonuçları Şekil 3.2.'de özetlendi.



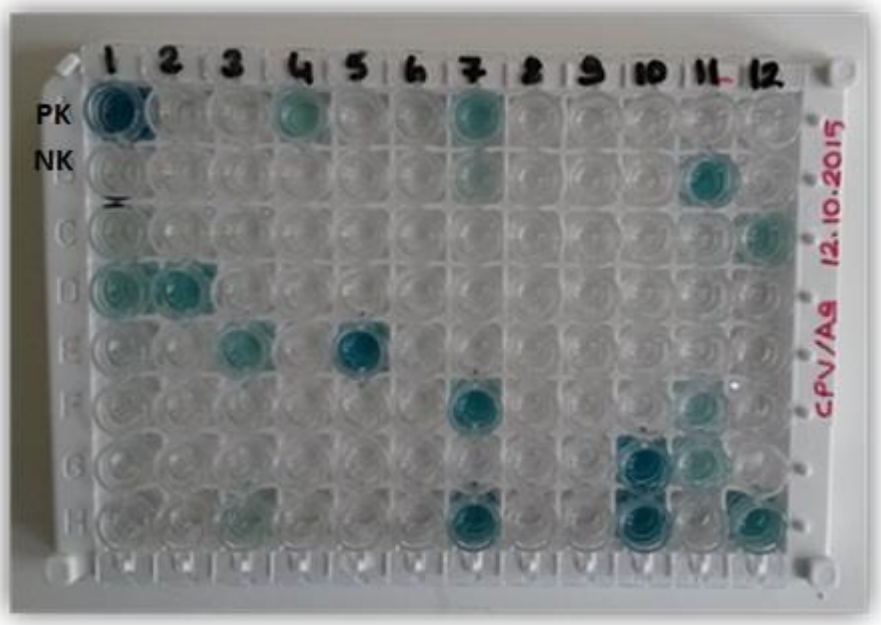
Şekil 3.1. Hızlı test (+) ve (-) sonuçlar.



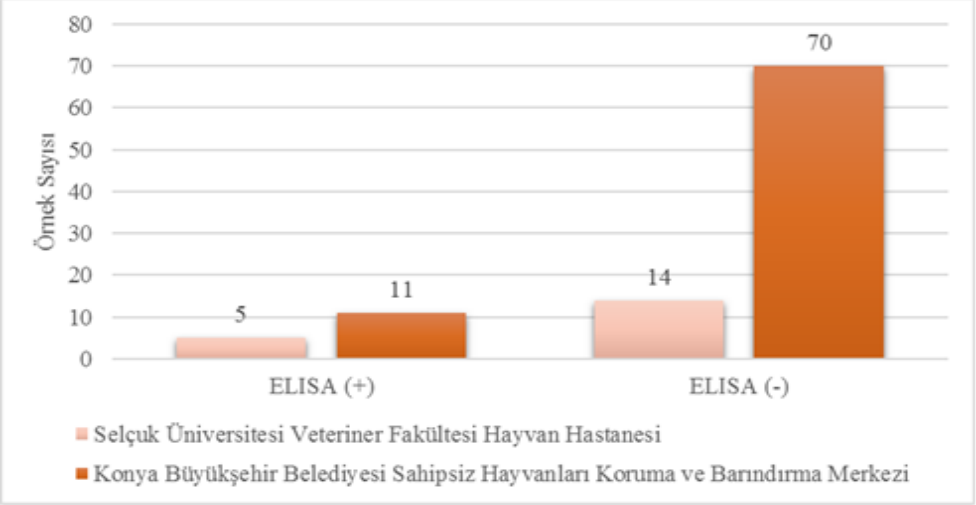
Şekil 3.2. Örneklerin toplandığı yerlere göre CPV hızlı test sonuçları.

3.2. ELISA

Direkt ELISA ile incelenen 100 adet köpeğe ait dışkı örnekleri CPV antijen varlığı yönünden değerlendirildi. Değerlendirme sonunda 16 örnekte (%16) CPV antijen varlığı saptandı. Örneklerden 84 adedi ise (%84) CPV antijen varlığı yönünden negatif olarak belirlendi (Şekil 3.3.). Çalışmanın direkt ELISA sonuçları Şekil 3.4.'de özetlendi.



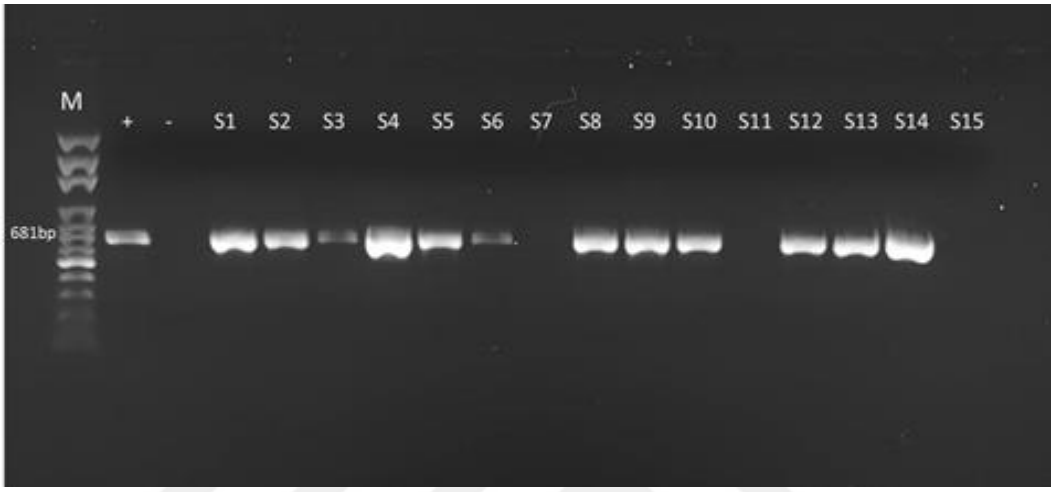
Şekil 3.3. Dışkı örnekleri ile gerçekleştirilen direkt ELISA sonuçları.



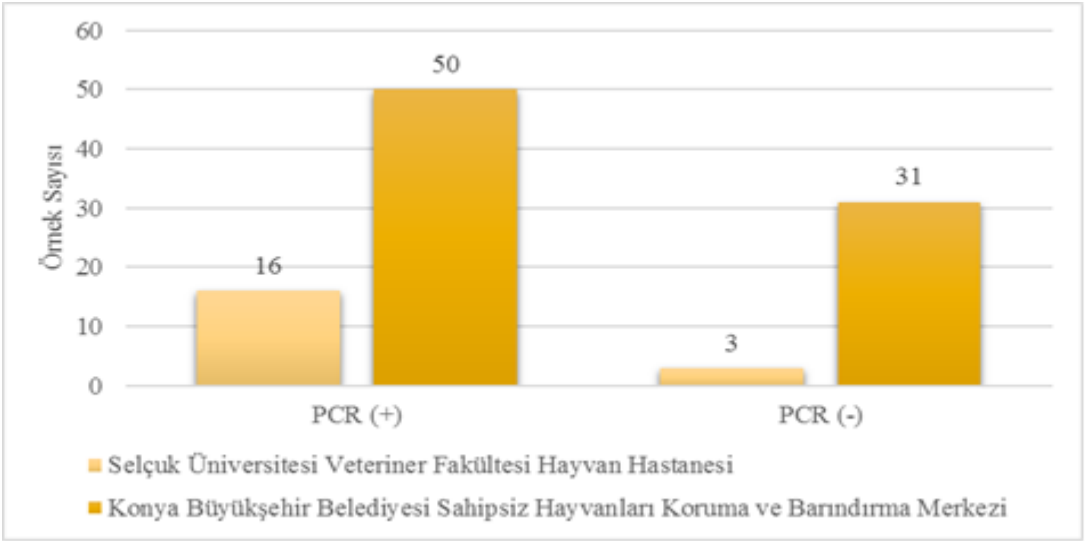
Şekil 3.4. Örneklerin toplandığı yerlere göre CPV ELISA sonuçları.

3.3. PCR

Konvansiyonel PCR ile incelenen 100 adet köpeğe ait dışkı örneklerinden 66 adedi (%66) CPV antijen varlığı yönünden pozitif olarak tespit edilirken 34 adedi (%34) negatif olarak belirlendi (Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.). Çalışmanın toplu sonuçları Çizelge 3.1.'de özetlendi.



Şekil 3.5. PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü.
M : Marker 100 bp DNA leader, + : CPV pozitif kontrol, - : CPV negatif kontrol, S1,S2…S15 : Örnekler.



Şekil 3.6. Örneklerin toplandığı yerlere göre CPV-2ab PCR sonuçları.

Çizelge 3.1. Hayvanlara ait dışkı örneklerinin toplu test sonuçları.

No	Cinsiyet	Yaş	Hızlı Test	ELISA	PCR	No	Cinsiyet	Yaş	Hızlı Test	ELISA	PCR	No	Cinsiyet	Yaş	Hızlı Test	ELISA	PCR	No	Cinsiyet	Yaş	Hızlı Test	ELISA	PCR
1	♂	8-12 Ay	-	-	+	26	♂	3-6 Ay	-	-	+	51	♀	0-1 Ay	-	-	-	76	♀	0-1 Ay	-	-	-
2	♂	1-3 Ay	+	-	+	27	♂	3-6 Ay	-	-	+	52	♀	0-1 Ay	-	-	+	77	♀	0-1 Ay	-	-	-
3	♀	0-1 Ay	-	-	+	28	♂	1-3 Ay	-	-	+	53	♀	0-1 Ay	-	-	+	78	♀	0-1 Ay	-	-	+
4	♀	1-3 Ay	-	-	+	29	♂	3-6 Ay	-	-	+	54	♀	0-1 Ay	+	-	+	79	♂	0-1 Ay	-	-	-
5	♀	1-3 Ay	+	+	+	30	♂	1-3 Ay	-	-	-	55	♀	0-1 Ay	-	-	+	80	♂	0-1 Ay	-	-	-
6	♀	1-3 Ay	-	-	+	31	♀	1-3 Ay	+	-	+	56	♀	0-1 Ay	-	-	+	81	♀	1-3 Ay	-	-	+
7	♂	1-3 Ay	-	-	-	32	♂	3-6 Ay	-	-	+	57	♀	0-1 Ay	-	-	+	82	♀	1-3 Ay	-	-	-
8	♀	1-3 Ay	-	-	+	33	♀	1-3 Ay	+	+	+	58	♀	0-1 Ay	-	-	-	83	♀	1-3 Ay	-	-	-
9	♂	1-3 Ay	+	+	+	34	♂	1-3 Ay	+	-	+	59	♀	0-1 Ay	-	-	-	84	♀	1-3 Ay	-	-	-
10	♀	1-3 Ay	+	-	+	35	♂	1-3 Ay	-	-	-	60	♀	0-1 Ay	-	-	-	85	♂	1-3 Ay	-	-	-
11	♂	1-3 Ay	-	-	-	36	♀	8-12 Ay	+	-	+	61	♀	0-1 Ay	-	-	+	86	♀	1-3 Ay	-	-	-
12	♂	3-6 Ay	+	+	+	37	♂	3-6 Ay	+	+	+	62	♀	0-1 Ay	-	-	+	87	♂	1-3 Ay	-	-	-
13	♀	1-3 Ay	+	-	+	38	♂	3-6 Ay	-	-	-	63	♀	0-1 Ay	+	+	+	88	♂	1-3 Ay	-	-	-
14	♂	1-3 Ay	-	-	+	39	♂	6-8 Ay	-	-	-	64	♀	0-1 Ay	-	-	+	89	♀	1-3 Ay	-	-	+
15	♂	1-3 Ay	-	-	-	40	♂	6-8 Ay	-	-	-	65	♂	1-3 Ay	+	-	+	90	♀	1-3 Ay	-	-	-
16	♂	1-3 Ay	+	+	+	41	♀	6-8 Ay	-	-	-	66	♂	0-1 Ay	-	-	+	91	♂	1-3 Ay	-	-	+
17	♂	3-6 Ay	+	+	+	42	♂	3-6 Ay	-	-	-	67	♂	0-1 Ay	-	-	-	92	♀	1-3 Ay	-	-	+
18	♂	3-6 Ay	-	-	+	43	♀	3-6 Ay	-	-	+	68	♂	0-1 Ay	-	-	+	93	♀	1-3 Ay	-	-	+
19	♂	1-3 Ay	-	-	+	44	♂	6-8 Ay	-	-	-	69	♂	0-1 Ay	+	+	+	94	♂	1-3 Ay	-	-	+
20	♀	3-6 Ay	-	-	+	45	♂	8-12 Ay	-	-	-	70	♂	1-3 Ay	-	-	+	95	♂	1-3 Ay	-	-	+
21	♀	3-6 Ay	-	-	+	46	♂	8-12 Ay	-	-	-	71	♂	0-1 Ay	+	+	+	96	♀	1-3 Ay	-	-	+
22	♀	3-6 Ay	-	-	+	47	♂	0-1 Ay	+	+	+	72	♀	1-3 Ay	-	-	+	97	♂	1-3 Ay	-	-	-
23	♀	1-3 Ay	-	-	+	48	♀	0-1 Ay	-	-	+	73	♂	1-3 Ay	-	-	-	98	♂	1-3 Ay	+	+	+
24	♂	3-6 Ay	+	+	+	49	♀	1-3 Ay	-	-	+	74	♂	1-3 Ay	-	-	-	99	♀	1-3 Ay	+	+	+
25	♂	1-3 Ay	-	-	+	50	♂	0-1 Ay	+	+	+	75	♀	1-3 Ay	-	-	-	100	♂	1-3 Ay	+	+	+

1-19: S.Ü. Veteriner Fak. İç Hastalıkları ABD kliniklerine getirilen hasta köpeklerden alınan numuneler,
20- 100: Konya Büyükşehir Belediyesi Hayvan Barınakların'da bulunan köpeklerden alınan numuneler.
Mavi satır: Sadece PCR (+), Yeşil satır: Hızlı Test ve PCR (+), Kırmızı satır: Hızlı Test, ELISA ve PCR (+).

3.4. Teşhis Yöntemleri Arasındaki Farkın İstatistiksel Karşılaştırılması

Araştırmada kullanılan teşhis yöntemleri arasındaki farkın istatistiksel karşılaştırılması Çizelge 3.2.'de belirtildi.

Çizelge 3.2.Araştırmada kullanılan testler sonucunda elde edilen pozitif sonuçların istatstiksel karşılaştırılması.

Yapılan Testler	Sonuç
PCR	66/100[a]
Hızlı Test	24/100[b]
ELISA	16/100[c]

[a,b,c] Mc Nemar Testi'ne göre istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

3.5. Yaş ve Cinsiyetin Hastalık Üzerine Etkisinin İstatistiksel Karşılaştırılması

PCR testi baz alınarak, yaşın hastalık üzerine etkisi ise Çizelge 3.3.'de cinsiyetin hastalık üzerine etkisi Çizelge 3.4.'de, belirtildi.

Çizelge 3.3. Yaşın CPV-2 Üzerine Etkisi.

Yaş Grubu	Örnek Sayısı	Hızlı Test	ELISA	CPV-2ab PCR
0-1 Ay	28	6 (%21,3)	5 (%17,86)	19 (%67,86)[a]
1-3 Ay	49	13 (%26,53)	7 (%14,29)	32 (%65,31)[a]
3-6 Ay	15	4 (%26,7)	4 (%26,7)	13 (%86,67)[a]
6-8 Ay	4	-	-	-
8-12 Ay	4	1 (%25)	-	2 (%50)[a]
TOPLAM	100	24	16	66

[a] Ki kare Testi'ne göre istatistiki açıdan önemsizdir ($p>0,05$).

Çizelge 3.4. Cinsiyetin CPV-2 Üzerine Etkisi

Cinsiyet	Örnek Sayısı	CPV-2ab PCR
♂	52	31 (%59)[a]
♀	48	35 (%72)[a]

[a] Ki kare Testi'ne göre istatistiki açıdan önemsizdir ($p>0,05$).

3.6. Teşhis Yöntemlerinin Spesifite ve Sensitivite Değerlerinin Karşılaştırılması

Araştırmada kullanılan testlerin spesifite ve sensitivite oranları Çizelge 3.5.'de belirtildi.

Çizelge 3.5. Araştırmada kullanılan testlerin spesifite ve sensitivite sonuçları.

		PCR +	PCR -
HIZLI TEST	+	24[a]	0[b]
	-	42[c]	34[d]

Sensitivite(%)=36,36
Spesifite (%)=100

		PCR +	PCR -
ELISA	+	16[a]	0[b]
	-	50[c]	34[d]

Sensitivite (%)=24,24
Spesifite (%)=100

a= Gerçek Pozitif (GP), b= Yalancı Pozitif (YP), c= Yalancı Negatif (YN), d= Gerçek Negatif (GN)
Sensitivite (%)= GP/(GP+YN)*100, Spesifite (%)= GN/(GN+YP)*100.

4.TARTIŞMA

Keşfedildiği 1978 yılından bu yana özellikle evcil ve vahşi genç köpeklerde şiddetli gastroenteriritis bulguları ile kendini gösteren CPV-2, kendini yenileyebilen, daha virulent ve dirençli alt türlere evrimleşebilme yeteneğine sahip bir etken karakteri göstermektedir. İnsidensinde yıllardır devam eden bir süreklilik sergileyen özellikleriyle günümüzde yaygınlığını ve önemini yitirmeyen önemli viruslar arasında sayılmaktadır. Zoonoz karakter taşımamasına rağmen gelecekte pet hayvancılığında daha da önemli problemlere yol açacağı düşünülen bu virusun, çoğunluğunu zoonozların oluşturduğu "emerging viruslar" olarak sınıflandırılan ve Dünya Bankasının açıkladığı verilere göre (sadece beş hastalığın 1997-2009 yılları arasında dünyaya ekonomik maliyeti 80 milyar dolar) ekonomide büyük kayıplara yol açan etkenler arasında sınıflandırılması gerektiği ileri sürülmektedir (Johnson 2014).

Köpeklerdeki en yaygın enterik patojenlerden biri olarak kabul edilen CPV-2 tüm dünyada ciddi ve yaygın enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yeni antijenik tiplerin ortaya çıkışı ve virusun çevre koşullarına olan direnci bu hastalığın enzootik durumunun korunmasına katkıda bulunan faktörlerdir (Decaro ve ark 2007, Nandi ve ark 2013). Yapılan tedavilere rağmen mortalite ve morbidite oranlarının yüksek olduğu belirlenen CPV-2 enfeksiyonlarında etkenin yalnızca lokal gastroenteritis hasarına sebep olmadığı aynı zamanda sistemik bir enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir (Prittie 2004).

Dünyanın farklı ülkelerinde yapılan çok sayıdaki araştırma (Pereira ve ark 2000, Sakulwira ve ark 2003, Ntafis ve ark 2010, Decaro ve ark 2011, Ahmed ve ark 2012) CPV-2 enfeksiyonlarının önemi ve yaygınlığını ortaya koymuştur. Brezilya'da gerçekleştirilen bir çalışmada (Pereira ve ark 2000), klinik olarak ishal semptomları gösteren köpeklerde CPV-2'nin görülme oranının oldukça yüksek olduğu belirlenirken, 1980'li yıllarda etkenin CPV-2a tipi daha yaygın olarak saptanmış, 1990-1995 yılları arasında ise virusun CPV-2b tipinin görülme oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Pinto ve ark 2012) Brezilya'nın farklı bölgelerinden 1-12 aylık 144 köpekten toplanan dışkı numuneleri CPV-2 yönünden PCR ile analiz edildiğinde toplam 42 (%29,2) numune pozitif belirlenirken

bu numunelerin 1 (%2,4)'i CPV-2a, 8 (%19)'i CPV-2b ve 33 (%78,6) tanesi CPV-2c olarak tespit edilmiştir.

Sakulwira ve ark (2003) tarafından Tayland'da PCR teşhis yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada yüksek oranda (%62,8) CPV-2 pozitifliği elde edildiği belirtilmiştir. Hindistan'da kusma ve ishal semptomları gösteren 36 adet köpeğe ait numunenin PCR ile CPV-2a/2b yönünden test edilmeleri sonucu 16 (%44,4) adet numunede pozitiflik elde edildiği bildirilmiştir (Nandi ve ark 2010).

Yunanistan'ın farklı bölgelerinden 2008-2009 yılları arasında ishal semptomları gösteren köpeklerden toplanan 167 dışkı örneği PCR ile analiz edildiğinde 84 (%50,3) örnek CPV-2 yönünden pozitif belirlenirken yapılan sekans analizi sonucunda bu örneklerin 81'i CPV-2a, 1'i CPV-2b ve 2'si CPV-2c olarak belirlenmiştir (Ntafis ve ark 2010). Filipov ve ark (2011) Bulgaristan'da ishalli köpek dışkılarında CPV-2 varlığını tespit etmek amacı ile real-time PCR kullanarak yaptıkları çalışmada 42 örnekten 40 tanesinin pozitif belirlendiğini ve yapılan çalışma sonucunda Bulgaristan'da en yaygın görülen tipin CPV-2a olduğunu bildirmişlerdir. Bağdat'ta 2011 yılında ateş, kusma ve kanlı ya da normal ishal şikayetleri ile veteriner hastanesine getirilen 12 köpekten 9 tanesi CPV-2 yönünden PCR ile pozitif olarak tespit edilmiştir (Ahmed ve ark 2012).

Decaro ve ark (2011) tarafından Batı Avrupa'da bulunan 7 farklı ülkedeki CPV-2 varlığını değerlendirmek için 156 dışkı numunesi ile real-time PCR kullanılarak yapılan çalışmada, 76 (%48,71) numune pozitif bulunurken bunların ülkelere göre dağılımı ise; İspanya için %27,7 (13/47), İtalya %53,8 (21/39), Fransa %61,5 (16/26), Almanya %71,4(15/21), İngiltere %87,5 (7/8), Belçika %40 (4/10) ve Hollanda için %0 (0/5) olarak bildirilmiştir.

Nijerya'da yapılan çalışmada (Chollom ve ark 2013) 109 köpekten toplanan numunelerin PCR testi ile CPV-2 yönünden araştırılması sonucu 52 adedinin (%47,70) pozitif olarak belirlendiği görülmüştür. Arnavutluk'da CPV-2'nin epidemiyolojik olarak araştırılması amacıyla yapılan araştırmada, 2011-2013 yılları arasında ishalli 57 köpekten örneklenen dışkılarda real-time PCR analizi neticesinde %92,98 gibi yüksek bir oranda pozitiflik belirlenmiştir (Cavalli ve ark 2014).

Portekiz'de altı farklı bölgeden 2012-2014 yılları arasında depresyon, ishal ve kusma gibi belirtilere sahip 209 adet köpekten toplanan dışkı numuneleri PCR ile değerlendirildiğinde 162 (%77,5) adet numune CPV-2 yönünden pozitif belirlenmiştir (Miranda ve ark 2015). Portekiz'de yapılan başka bir çalışmada (Miranda ve ark 2016) klinik belirtiler gösteren köpeklerden toplanan 260 adet dışkı numunesinin 198 (%76,2) tanesinin CPV-2 yönünden PCR testi ile pozitif olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Amrani ve ark (2016), Fas'ın farklı illerinden topladıkları 91 adet dışkı numunesini CPV-2 yönünden real-time PCR testi kullanarak incelediklerini ve %98,9 oranında pozitif sonuç tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Yüksek oranların belirlendiği ifade edilen yukarıdaki araştırmalarda sıklıkla real-time PCR testi kullanıldığı dikkate alınmalıdır. Bu test kullanılarak Filipov ve ark (2011) %95,2, Cavalli ve ark (2014) %92,98 ve Amrani ve ark (2016) tarafından %98,9 gibi yüksek oranda dışkı örneklerinden viral antijen tespiti yapılırken bu araştırmada en yüksek oran %66 olarak klasik PCR tekniğiyle elde edilebilmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından kullanılan real-time PCR tekniğinin daha hassas bir yöntem olduğu düşüncesini akla getirebilir, ancak örneklemenin yapıldığı ülke ve bölgede ki enfeksiyonun endemik durumu, örnekleme yapılan hayvanların yaşları (örneğin Cavalli ve ark'nın numune aldığı hayvanların neredeyse tamamı 1-3 aylık) gibi özellikler de göz önünde tutulması gereken unsurlar olarak değerlendirilmeli ve bu gibi özellikler araştırmalarda kullanılan bütün testlerin güvenilirliliğinin belirlenmesinde unutulmamalıdır. Decaro ve ark (2011)'nın Batı Avrupa'da bulunan 7 farklı ülkeden aynı tarihlerde topladıkları numunelerin analizleri sonucunda ülkeler arasında elde edilen antijen pozitivite oranlarının birbirinden farklı olduğunu ortaya koyması da bunun bir kanıtıdır.

Tüm dünyada yapılan çalışmalar ile köpeklerde parvoviral enfeksiyonlarının yaygınlığı ortaya konurken Türkiye'de bu hastalık ile ilgili veriler kısıtlıdır. Yapılan bir araştırmada köpeklerde parvoviral enteritis varlığı ilk kez 1980 yılında incelenen 2 erişkin ve 1 yavru köpekte, sonrasında 1981 yılında 16 yavru köpekte makroskobik ve mikroskobik bulgulara dayanılarak saptanmış (Berkin ve ark 1981), 2002 yılında ise hafif enteritis bulgulu 6 aylık bir köpekte parvovirus varlığı Türkiye'de ilk kez PCR yöntemi kullanılarak teşhis edilmiştir (Özkul ve ark 2002).

Bursa bölgesinde yapılan bir çalışmada (Yılmaz ve ark 2005) 60 adet köpeğin 21'inde (%35) CPV-2 pozitif tespit edildiği bunlardan da CPV-2a varyantının CPV-2b varyantına oranla daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Bursa'da yapılan başka bir çalışmada (Yeşilbağ ve ark 2007) ise 4 aydan küçük 90 yavru köpekten alınan dışkı numunelerinde %35,5 oranında pozitiflik belirlendiği, bu örneklerde yapılan tiplendirme sonucunda CPV-2a'nın CPV-2b'den daha yüksek oranda bulunduğu vurgulanmıştır.

Kayseri'de yapılan bir araştırmada (Şahna ve ark 2008) 1-2 aylık ishalli 34 sokak köpeğinden alınan dışkı numunelerinde PCR testi ile %76,5 oranında CPV-2 varlığı belirlenmiştir. Türkiye'de 2015 yılında Ankara bölgesinde yapılan bir araştırmada ise 65 köpekten toplanan numunelerin CPV-2 yönünden PCR ile incelenmesi sonucu %38,4 oranında pozitiflik tespit edildiği, örneklerde CPV-2a tipinin CPV-2b'ye göre daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Timurkan ve Oğuzoğlu 2015). Türkiye'de enfeksiyonun varlığını ortaya koyan bu çalışmalar, morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalık olan CPV-2'nin hızlı ve güvenilir teşhisi ile ilgili detaylı bir araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı kliniğine getirilen ve Konya Büyükşehir Belediyesi'ne bağlı hayvan barınağında bulunan, toplam 100 adet ishalli köpeğe ait dışkıda CPV-2ab'ye spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda %66 oranında pozitiflik elde edildi. Araştırmada elde edilen veri daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, Miranda ve ark (2015)'nın bildirdiği orana göre daha düşük bulunmuştur. Sakulwira ve ark (2003)'nın sonuçları ile karşılaştırıldığında ise tarafımızdan elde edilen oranlar oldukça benzer gözlenmiştir. Yılmaz ve ark (2005), Yeşilbağ ve ark (2007) ve Timurkan ve Oğuzoğlu (2015)'nun bildirdikleri sonuçlar ile değerlendirildiğinde mevcut araştırma oranının daha yüksek olmasının çalışmada kullanılan numunelerin büyük çoğunluğunun barınakta bir arada bulunan ve yeterince maternal antikora sahip olup olmadığı konusunda tereddütler bulunan köpeklerden elde edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Populasyonun yoğun olduğu, köpek yetiştiriciliğinin ve üretiminin yapıldığı yerler ile barınaklar başta olmak üzere CPV-2 enfeksiyonlarının kısa bir zaman içerisinde ve çabuk bir şekilde teşhis edilebilmeleri, enfekte hayvanların etkeni

bulaştırabilecekleri hassas hayvanlarla temaslarının bir an önce engellenmesini ve parvovirus enfeksiyonu nedeniyle sekonder enfeksiyonlara karşı hassas hale gelen bu hayvanlarda gerekli önlemlerin kısa süre içerisinde alınabilmesini ve bir an evvel uygun bir tedavinin uygulanabilmesini sağlamak açısından oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Günümüzde klinik teşhisin kesin olarak yapılamadığı durumlarda enfekte köpeklerin dışkılarında CPV-2'nin tespiti için birçok laboratuvar tekniği kullanılmaktadır (Desario ve ark 2005, Decaro ve ark 2010, Silva ve ark 2013, Tinky ve ark 2015). Bu tekniklerin arasında son yıllarda birçok etken için kullanıma sunulan hızlı test kitleri, oldukça basit ve çabuk uygulanabilmeleri nedeniyle klinik pratikte özellikle saha şartlarında çok yaygınlaşan bir teşhis metodu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hatta kolay uygulanabilirlikleri, saha sartlarında 4-25 ºC'de uzun süre saklanabilmeleri bu kitlerin veteriner hekimler kadar hayvan sahipleri tarafından da kullanılabilmesini sağlayabilmektedir (Esfandiari ve Klingeborn 2000). Ayrıca özel ekipmanlara ve uzman personele ihtiyaç duyulmayan hızlı test yöntemlerinde örnekleme yapıldıktan 10-15 dakika gibi kısa bir süre sonunda sonuçlar okunabilmektedir. PCR gibi moleküler teşhis yöntemlerinin ancak uzman personel tarafından yapılabilmesi ve uzun zaman sonunda sonuçların elde edilebilmesi nedeniyle sahada çalışan ve klinisyen veteriner hekimler tarafından saha koşullarında birçok hastalığın çabuk tanısı için hızlı testlere gereksinim duyulmaktadır. Özellikle barınak, köpek yetiştirme çiftlikleri gibi bir arada bakım ve beslenmesinin yapıldığı yerlerde, pet kliniklerine getirilen gastrointestinal sistem hastalıklarına sahip köpeklerde hızlı ve güvenilir teşhis büyük önem arz etmektedir. Diğer taraftan ELISA, PCR, HA ve virus izolasyon gibi teşhis metotları için özel ve gelişmiş laboratuarlara gereksinim duyulmaktadır. Örneğin HA testi uygulamalarında kullanılan eritrositlerin taze hazırlanmış olması gerekliliği vardır (Desario ve ark 2005), bu durum eritrositlerin temin edileceği hayvan türlerinin daima elde bulundurulması ihtiyacını doğurmaktadır. Ancak kullanım ve prosedür açısından avantajlarına rağmen hızlı testlerin hastalığın doğru teşhisinde zaman zaman yetersiz kaldığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Schmitz ve ark 2009, Miranda ve ark 2016).

Ticari hızlı test kitlerini üreten firmaların prospektüslerinde ya da internet sitelerinde bu kitlerin duyarlılıklarının %90-96 gibi çok yüksek bir oranda belirtilmiş olmasına rağmen Schmitz ve ark (2009) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada,

Snap Test, FASTtest ve Witnesscard adı verilen üç farklı ticari hızlı test kitinin PCR testi ile karşılaştırılması sonucu duyarlılıklarının sırasıyla %18,4, %15,8 ve %26,3 gibi oldukça düşük oranlarda saptandığı bildirilmiştir. Bu araştırmada da ticari bir hızlı kit ile elde edilen %36,36'lık duyarlılık oranı, uygulanabilirliği oldukça basit olan hızlı test kitlerinin güvenilirliklerinin oldukça zayıf olduğunu ortaya koymuştur. Laboratuvarlarımızda farklı viral etkenler için hazırlanmış ticari hızlı test kitlerinin duyarlılıkları üzerine yapılan birçok çalışmada da bu oranın %60-70'in üzerine çıkmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, duyarlılıkları düşük olmasına rağmen özgüllüğü (spesifite) yapılan mevcut araştırmada da belirlendiği (%100) gibi oldukça yüksek olan bu testlerde elde edilen pozitif bir sonuç büyük olasılıkla CPV-2 enfeksiyonuna işaret ederken, özellikle ishal semptomu gösteren köpeklerde negatif olarak elde edilen sonuçlarda parvovirusun göz ardı edilmemesi ve dışkı örneklerinin PCR gibi duyarlı bir test ile incelenerek sonuçların tekrar yorumlanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Silva ve ark (2013)'nın yaptıkları araştırmada; bir yaşın altındaki, ishal semptomu gösteren yavru köpeklere ait 112 dışkı numunesini hem hızlı test hem de PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda CPV-2 yönünden hızlı testin PCR'a göre sensitivitesinin %77,2, spesifitesinin ise %100 olduğu tespit edilmiştir.

Decaro ve ark (2013) CPV-2 yönünden hızlı testin sensitivite ve spesifitesini hemaglutinasyon (HA) testi ve real-time PCR ile karşılaştırmayı amaçladıkları çalışmada, hızlı testin HA testine göre sensitivitesini %86,3, spesifitesini %96,1, real-time PCR testine göre sensitivitesini %65,3, spesifitesini %100 olarak tespit etmişlerdir.

Tinky ve ark (2015) ishalli köpek dışkılarından CPV teşhisinde kullanılan hızlı test ve PCR'ın teşhis potansiyelini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada hızlı testin PCR'a göre sensitivitesi %72,73, spesifitesi %92,86 olarak tespit edilmiştir. Elde ettikleri verileri McNemar testi ile karşılaştırmış ve iki test arasında istatistiki olarak önemli fark olmadığını bildirmişlerdir ($p>0.05$).

Miranda ve ark (2016) tarafından yapılan bir çalışmada klinik belirtiler gösteren köpeklerden toplanan 260 dışkı numunesinin 198 (%76,2) tanesi PCR ile

CPV-2 yönünden pozitif tespit edilirken, tüm örneklerin hızlı test ile değerlendirilebilen 109 tanesinin 61 (%56)'inde pozitiflik bildirilmiştir.

Mevcut çalışmada ishalli köpeklerden örneklenen 100 dışkı numunesi hızlı test ve PCR tanı yöntemleri ile CPV-2 yönünden incelenerek, bu iki metot sonuçları sensitivite ve spesifite açısından karşılaştırıldı. Elde edilen pozitif oranlar, hızlı test için %24, PCR için %66 olarak tespit edildi. Hızlı testin PCR'a göre sensitivitesi %36,36, spesifitesi %100 olarak belirlendi (Çizelge 3.5.). Ayrıca elde edilen veriler McNemar testi ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak fark önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 3.2.). Mevcut araştırma sonuçları diğer çalışmalar ile değerlendirildiğinde hızlı testin spesifitesi birçok araştımacının sonuçları ile uyumlu olarak (%100) bulundu (Schmitz ve ark 2009, Silva ve ark 2013, Decaro ve ark 2013). Bu durum hızlı testin yanlış pozitif sonuç verme oranının çok düşük olduğunu PCR ile negatif olan sonuçların hızlı test ile de negatif olduğunu göstermektedir. Schmitz ve ark (2009)'nın yaptıkları çalışma ile mevcut araştırmanın sensitivite oranları karşılaştırıldığında elde edilen sensitivite oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu konuda çalışan birçok araştırmacının (Silva ve ark 2013, Decaro ve ark 2013, Tinky ve ark 2015) sensitivite sonuçlarına göre mevcut araştırmanın sensitivite sonucu daha düşük bulunmuştur. Bunun temel nedeninin hastalığın ilerleyen dönemlerinde dışkı ile atılan viral partikül miktarının ve virus saçılımının azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. PCR gibi moleküler teknikler dışkıda az miktarda viral antijen olduğunda dahi pozitif sonuçlar verebilmektedir. Hızlı test dışkı ile atılan viral antijenlerin test kitinde konjuge olmuş spesifik antikorlara bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. Ancak bu testlerde net olarak görülebilir bir bandın şekillenebilmesi için viral antijen miktarının oldukça fazla olması ($>10^6$ DNA/mg dışkı) gerekliliği (Decaro ve ark 2013), testi kullanan kişi tarafından sonuçların yorumlanmasını etkileyebilmektedir. Testin negatif değerlendirilme ihtimali, virus miktarının oldukça düşük olduğu enfeksiyonun başlangıç safhasında ya da akut enfeksiyonun son dönemlerinde çok sık olarak gözlenebilmektedir. Ayrıca hastalığın ilerleyen dönemlerinde ve aşılı hayvanlarda meydana gelen subklinik enfeksiyonlarda dışkı ile atılan virusun azalmasına bağlı olarak da yanlış negatif sonuçlar yaygın olarak görülmektedir. Proksch ve ark (2015) CPV-2'nin tespitinde yaygın olarak kullanılan hızlı testte sık bildirilen yanlış negatifliğin nedenini belirlemek için yaptıkları çalışmada %51,3 oranında yanlış negatif sonuç elde

ettiklerini bildirmişlerdir. Daha az dışkılama oranı, dışkıda viral partikülün az olması ve hayvanlardaki yüksek serum antikor seviyesi gibi faktörlerin hızlı test sonuçlarında negatifliğin sebepleri arasında sayılabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda kan parametrelerindeki değişimlerin ve gözlenen klinik belirtilerin, hızlı test sonuçları ile uyumlu olamayabileceğini tespit etmişlerdir.

Dışkıda bulunan antijen varlığını ortaya koymak üzere kullanılan hızlı test kitlerinin hatalı negatif sonuçlar vermelerindeki akla gelen diğer bir olasılık, enfeksiyona neden olan CPV suşlarının sahada mutasyona uğramaları ve bu durumun klasik kitlerle tespit edilebilme imkanının mümkün olmamasıdır. Canine parvovirusun hızlı bir biçimde mutasyona uğrayabilmesi ve CPV suşlarındaki aminoasit dizilimlerinde meydana gelen multiple değişimlerin, antijenik varyantlar içerisinde bir seri mutantın meydana gelmesine yol açabileceği bilinmektedir. Sonuç olarak dışkıdaki virus miktarının düşük olması ya da iyileşme döneminde oluşan spesifik antikorların CPV antijenine bağlanması, yanlış negatif sonuçların en önemli nedeni olarak görülmüş ve CPV klinik belirtilerine sahip köpeklerin dışkı örneklerinden PCR ile tekrar test edilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Canine parvovirusun teşhisinde kullanılan bir başka metot olan ELISA ise hızlı teste göre daha fazla zaman, iş gücü ve laboratuar imkanına ihtiyaç duyan bir test olarak tanımlanmaktadır. Ancak ELISA, PCR yöntemine göre daha kısa sürede sonuç vermesi, daha az maliyete sahip olması ve daha az uzman personele ihtiyaç duyması sebebiyle laboratuvarlarda tercih edilen yöntemlerden bir tanesidir (Prittie 2004). Ayrıca ELISA'nın PCR'a karşı teknik olarak kolay bir yöntem olması epidemiyolojik çalışmalarda daha sıklıkla kullanılmasını sağlamıştır.

Richards ve ark (2003)'nın yaptıkları çalışmada dışkıdan viral antijenlerin ELISA ve RT-PCR ile belirlenmesinde ELISA'nın sensitivitesini %55,5, spesifitesini %98,3 olarak bildirmişlerdir. İzzo ve ark (2012) tarafından yapılan real-time PCR ve ELISA testlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada sensitivite ve spesifite oranları BCoV yönünden sırasıyla %26,7, %91,7; BRV yönünden ise %44,7, %86,4 olduğu belirtilmiştir.

Mevcut çalışmada ishalli köpeklerden örneklenen 100 dışkı numunesi ELISA ve PCR tanı yöntemleri ile CPV-2 yönünden virolojik olarak incelendi ve bu iki

metot sonuçları sensitivite ve spesifite açısından karşılaştırıldı. ELISA'nın PCR'a göre sensitivitesi %24,24 ve spesifitesi %100 olarak belirlendi (Çizelge 3.5.). Ayrıca elde edilen veriler McNemar testi ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak fark önemli bulundu ($p<0.05$) (Çizelge 3.2.). ELISA metodu antijen-antikor bağlanması esasına dayanan bir yöntem olması nedeniyle dışkı ile atılan virus miktarı testin sonuçlarını etkileyebilmektedir. Araştırma sonuçları yapılan diğer çalışmalar (Richards ve ark 2003, İzzo ve ark 2012) ile karşılaştırıldığında ELISA, PCR ve real-time PCR gibi moleküler tanı yöntemlerine göre daha düşük spesifiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum dışkıdaki virus yoğunluğuna bağlı olarak sonuçların değişebildiği şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca ELISA kit prospektüsünde yazan tespit edilebilir limitin gerçeği yansıtmadığı belirtilmiştir (İzzo ve ark 2012). Dışkıda antijen-antikor komplekslerinin varlığı, örneklerdeki aşırı fekal kontaminasyonlar, ELISA yüzeyindeki kaplı antikorların affinitelerinin düşük olması veya proteazların varlığı sonuçları olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Richards ve ark 2003).

Araştırmacılar (Decaro ve ark, 2005) tarafından, doğal ve deneysel enfeksiyon çalışmalarında HA ve virus izolasyonu gibi tekniklerle CPV-2'nin sadece enfeksiyondan sonraki birkaç gün gibi sınırlı bir süre içerisinde tespit edilebildiği, real-time PCR ile yüksek miktarda viral DNA miktarı varlığı belirlenen örneklerde bile bu tekniklerle hatalı negatif sonuçların gözlenebildiği olguların oldukça yaygın olduğu vurgulanmıştır. Bu çelişkili durum, enfeksiyondan kısa bir süre sonra köpeklerin dışkılarında testlerin sonuçlarını etkileyecek biçimde, CPV-2'ye özgü yüksek miktarda antikor varlığının ortaya çıkması şeklinde açıklanmıştır. Bu araştırmada da ELISA ve hızlı test sonuçlarında pozitiflik oranının oldukça düşük çıkması, CPV-2 virionlarına bağlanan fekal antikorların bu testlerle viral antijen varlığının ortaya konulmasını engellediği hipotezini destekler niteliktedir. Bütün bunların aksine PCR tabanlı metotların (klasik ya da real-time) antikor varlığında bile viral antijen tespitinde geleneksel metotlardan çok daha duyarlı olduğu bilinen bir gerçektir. Bazı araştırmacıların yapmış olduğu deneysel çalışmalarda virus inokulasyonundan sonra CPV saçılımının 3-4 gün içerisinde gerçekleşmesi (Meunier ve ark 1985), bu saçılımın 4-7. günlerde en üst seviyeye ulaşması (Goddard ve Leisewitz 2010) söz konusudur. Enfeksiyondan sonra hemaglutinasyon, virus izolasyonu, ELISA ve hızlı test gibi yöntemlerle ancak birkaç gün ile 11 gün arasında virus tespiti yapılabilirken, PCR tekniğiyle viral DNA tespitinin

enfeksiyondan sonraki 6. haftaya kadar uzun bir süre mümkün olabilmesi (Decaro ve ark 2005, Goddard ve Leisewitz 2010) bu araştırmada PCR testi pozitif sonuçlarının diğer testlere göre daha yüksek çıkmasını açıklayan unsurlardan birisi olarak düşünülebilir.

Mevcut araştırmada, CPV-2 yönünden ELISA ve hızlı test sonuçları karşılaştırıldığında bu testlerin istatistiki olarak farklı olduğu belirlendi ($p<0.05$). Esfandiari ve Klingeborn (2000) kendilerinin hazırladıkları hızlı test kitini farklı ELISA kitleri ile karşılaştırdıkları çalışmada sensitiviteyi %100, %97,1, %60, %95,8 gibi farklı oranlarda saptamalarına rağmen spesifiteyi ise sırasıyla %100, %98,6, %100 ve %99,7 gibi yüksek oranda belirlediklerini bildirmişlerdir. Farklı viruslarla İzzo ve ark (2012) tarafından yapılan hızlı kit ve ELISA testlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada sensitivite ve spesifite oranlarının BCoV yönünden sırasıyla %33,3 ve %80,4; BRV yönünden ise %67,8 ve %95,2 olduğu belirtilmiştir.

Araştırmada sonuçların değerlendirilmesinde özellikle duyarlılık konusunda yaşanabilecek problemleri en aza indirgeme adına ve hazırlanmaları aşamasında en azından aynı laboratuarların ve şartların kullanıldığı varsayılarak bir birliktelik sağlanması düşüncesiyle ELISA ve hızlı test kitlerinin temini aynı ticari firmadan yapıldı. Buna rağmen birçok enfeksiyonun teşhisinde rutin olarak kullanılan ve güvenilirliği konusunda daha az tereddütlerin olduğu düşünülen ELISA ile elde edilen antijen pozitivitesinin istatistiki açıdan önem arz edecek biçimde hızlı test sonuçlarına göre daha az oranda belirlenmiş olmasının, yani hızlı test kitinin CPV-2 antijenini belirlemedeki duyarlılığının daha yüksek oranda ortaya çıkmasının açıklamasını yapmak oldukça zordur. Bu durum hızlı kitlerin sonuçlarının sadece çıplak gözle değerlendirildiği düşünülürse dışkı gibi oldukça farklı kontaminantların barındığı bir örneğin kitlerin yapısında bulunan nitroselüloz membranların üzerinde nonspesifik kalıntılar oluşturabileceği ve hafif bir bant oluşumunun dahi sonucun pozitif olarak yorumlanması ihtimalini artırabileceği şeklinde yorumlanabilir. Ancak yapılan kaynak taramalarında CPV-2 ile ilgili antijen ELISA ve hızlı test kitlerinin karşılaştırıldığı özellikle yorumlamada faydalanılabilecek çalışmaların sınırlı olması ve yapılan bu araştırmada PCR testi ile negatif olarak belirlenen dışkı örneklerinin hiçbir tanesinde hızlı kit ile yorumlama zorluğu yaşatabilecek zayıf bir bant oluşumunun dahi tespit edilememiş olması yani testin spesifitesinin %100 olarak

belirlenmesi bu durumun tam olarak açıklanamamasına neden olmuştur. Bununla beraber ELISA kitinin kalitesi, uygulama ve hazırlama protokollerindeki değişiklikler (testin yapıldığı ortam, kullanılan kimyasalların ısıları, yıkamanın elle ya da makine ile yapılması gibi farklılıklar) kitin hassasiyetini etkileyebilen faktörler olarak göz önünde tutulmalıdır. Ayrıca kit prosedüründe belirtilmemesine rağmen hızlı test ve ELISA kitinin temin edildiği firmadan alınan bilgiler doğrultusunda ELISA kitinin hazırlanışında tek monoklonal antikor kullanılmasının aksine hızlı test kitinde çift monoklonal antikor kullanılması hızlı testin ELISA'ya göre daha duyarlı olmasını açıklayabilir.

Köpeklerin parvovirus enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda yaşın hastalık üzerine önemli bir etkisi olduğu ve özellikle 6 aydan küçük ve kolostrum almamış yavrularda görülme oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Aktaş ve ark 2011, Sakulwira ve ark 2003).

Timurkan ve Oğuzoğlu (2015)'nun yaptıkları çalışmada 1-3 aylık köpeklerde CPV-2 oranı %57,1 olarak belirlenirken, 4-6 aylık köpeklerde bu oran %23,8 olarak bildirilmiştir. Aktaş ve ark (2011)'nın yaptıkları çalışmada, istatistiksel olarak yaş faktörünün hastalık üzerine önemli bir etkisi olduğu belirlenmiş ve CPV'nin sebep olduğu enteritisin 2-3 ve 3-4 aylık köpeklerde daha yoğun görüldüğü belirtilmiştir.

Sakulwira ve ark (2001) yaptıkları çalışmada, yaşlara göre CPV-2 görülme oranını değerlendirdiklerinde 1-2 aylık köpeklerde bu oran %62,5, 3-6 aylıklarda %73,3, 6 aylıktan büyük köpeklerde ise %0 olarak tespit edilirken, Sakulwira ve ark (2003) tarafından yapılan başka bir çalışmada 1-2 aylık köpeklerde %70,5, 3-6 aylıklarda %73,5 ve 6 aylıktan büyüklerde ise oran %0 olarak belirtilmiştir. Altı aydan büyük köpeklerde CPV-2 görülme oranının düşük olmasının sebebini subklinik enfeksiyonlara bağlı olarak immunitenin gelişmiş olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Sakulwira ve ark 2001, Sakulwira ve ark 2003).

Bu araştırmada 0-12 aylık ishal semptomu gösteren köpeklerden örnekleme yapıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde 3-6 aylık köpeklerde enfeksiyonun görülme oranının daha yüksek olduğu belirlenmesine karşın istatistiki olarak yaşlar arası önemli fark olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Çizelge 3.3.). Aktaş ve ark (2011)'nın yaptıkları çalışma sonucunda yaşın istatistiki olarak hastalık üzerine etkili olduğu

bulunmasına karşın, mevcut araştırmada istatistiki olarak fark bulunmamasının sebebi örnekleme yapılan köpeklerin yaş grupları içerisindeki sayısal dağılımının homojen olmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Araştırmada PCR testi baz alındığında enfeksiyonun dişi hayvanlarda (%72) erkek hayvanlara (%59) göre daha yüksek oranda gözlendiği tespit edilmesine karşın istatistiki olarak fark elde edilememiştir ($p>0.05$) (Çizelge 3.4.). Yapılan bazı araştırmalarda, CPV enfeksiyonları ile cinsiyet arasında bir ilişki olmadığı (Gisilanbe ve ark 2005, Castro, 2007, Proksch ve ark 2015) bildirilmekle beraber Houston ve ark (1996), 6 aylıktan büyük erkek köpeklerde CPV enteritisinin görülme riskinin dişilerle kıyaslandığında çok daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Aktaş ve ark (2011) tarafından ülkemizde gerçekleştirilen bir araştırmada enfeksiyonun erkeklerde dişilere kıyasla daha fazla geliştiğini belirlemiş ve bu durumu Erzurum ve çevresindeki sahipli köpeklerin daha çok erkek köpeklerden oluşması ve Houston ve ark (1996)'nın bildirdiği gibi erkek köpeklerin dişilere oranla daha çok gezme eğiliminde olmaları sebebiyle enfektif ajanlara maruz kalma risklerinin daha yüksek olduğu şeklinde açıklamışlardır. Ancak parvovirus gibi dış ortama dayanıklı olan ve buna bağlı olarak bulunduğu ortamda bulaşıcılığının yüksek olduğu bilinen bir etkenin tespiti için örnekleme yapılan bölgenin endemik durumu, araştırmalarda kullanılan hayvanların yaş dağılımları, aşılı olup olmadıkları ve örneklenen hayvanların cinsiyet dağılımlarının dengeli oluşturulmaması gibi durumlar dikkate alındığında bu açıklamaların çok da yeterli olmadığı ve cinsiyetin bu enfeksiyona maruz kalmada çok önemli bir unsur olarak göz önünde tutulmaması gerektiği düşünülmektedir.

Bu çalışmada dışkı numunelerinde CPV-2 varlığının moleküler teşhisinde uygulanan PCR metodunda hem CPV-2a hem de CPV-2b varyantlarını ortaya koyabilecek primerler kullanılmıştır. CPV-2'nin antijenik tiplerinin belirlenmesi için farklı primerlerin kullanıldığı PCR yöntemlerine ya da sekans analizi gibi ileri tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada ortak primer kullanımına bağlı olarak örneklerde varyant ayrımına gidilmediği için bu konu ile ilgili bir değerlendirme yapılamamıştır. CPV-2'nin antijenik tiplerinin belirlenmesine yönelik ileride yapılacak çalışmaların hedeflenmesinin özellikle Türkiye'de yaygın olarak görülen tipler konusunda fikir vermesi açısından önemli olabileceği düşünülmüştür.

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye ve tüm dünyada CPV enfeksiyonunun ciddi boyutlara ulaşması ve yavru köpeklerde hayati risk oluşturması nedeniyle hastalığın teşhisinde kullanılan metotlar ön plana çıkmaktadır. Özellikle köpek barınaklarında bakılan köpeklerde hastalığın erken teşhisi ile virusun yayılmasını engellemek ve klinisyen veteriner hekimlerin CPV enfeksiyonlarını hızlı bir şekilde tespit etmeleri ve buna göre uygun bir tedavi programı uygulayabilmeleri için hızlı teşhis yöntemleri önem arz etmektedir. Kullanılan teşhis metotlarının uygulama güçlükleri, maliyet ve güvenilirliklerindeki farklılıklar hastalığın teşhisinde daha ucuz ve daha güvenilir testlerin kullanımına olanak tanımıştır. Fakat mevcut araştırma sonuçları dikkate alındığında ucuz ve kullanımı kolay olan hızlı test ve ELISA'nın güvenilir sonuçlar vermesi açısından yetersiz olduğu gözlenmiştir. Özellikle hızlı test için ticari firmalar, sensitivite ve spesifite oranlarının %90'ın üzerinde olduğunu belirtmelerine rağmen mevcut araştırma sonuçları ile bu oran sağlanamamıştır. Yanlış pozitif sonuç oranının düşük olmasına karşın yüksek oranlarda yanlış negatif sonuçlara neden olabilen bu testler, hastalığın hızla yayılmasına katkı sağlayabilir. Hızlı test ve ELISA ile elde edilen sonuçların, moleküler bir yöntem ile desteklenmesi ya da hastalığın yayılmasının önüne geçilmesi için pahalı tedavi maliyetleri yerine erken teşhis de PCR gibi moleküler analizlerin kullanılması önerilebilir. Ayrıca daha yeni teşhis metotlarının geliştirilmesi ya da pratikte kullanımı kolay olan bu testlerin özellikle duyarlılıklarının artırılmasına yönelik çalışmaların yapılması önerilebilir. Bütün bunlara ilaveten mutasyon kabiliyetinin oldukça fazla olduğu bilinen CPV-2'nin tespiti için Türkiye'de kullanılan tüm ELISA ve hızlı kitlerin yurtdışından ithal edilmeleri nedeniyle teşhislerde suş farklılıklarına bağlı oluşabilecek yanılgıların ve yine bu enfeksiyon için koruyucu amaçlı kullanılan tüm aşıların ithal aşılar olması sebebiyle immun cevap ile ilgili ortaya çıkabilecek problemlerin açığa kavuşturulması, hatta kitlerin hassasiyetlerinin ve immun cevabın arttırılması adına Türkiye'de izole edilen ya da edilecek izolatlarla yapılacak araştırmaların bu enfeksiyon ile mücadelede çok büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca enfeksiyonla mücadelede canlı aşı suşunun antikor düzeyini olumsuz yönde etkileme ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla, maternal antikor titresinin tespiti için kullanılan HI testi ile sadece 1:80'in altında titreye sahip olduğu belirlenen yavrulara aşı uygulaması yapılmasının önemli bir unsur olduğu unutulmamalıdır.

6.KAYNAKLAR

Ahmed F, Shony MO, Karim, ZA, 2012. Detection of canine parvovirus in Baghdad city by pcr technique. Proceeding of the Eleventh Veterinary Scientific Conference, 95-98.

Aktaş MS, Özkanlar Y, Kırbaş A, 2011. Erzurum ve çevresinden kliniğe getirilen sahipli köpeklerin parvoviral enteritisini etkileyen risk faktörleri üzerinde bir araştırma. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 6(1), 1-8.

Aldaz J, García-Díaz J, Calleros L, Sosa K, Iraola G, Marandino A, Hernández M, Panzera Y, Pérez R, 2013. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador. Vet Microbiol, 166(1-2), 214-19.

Amrani N, Desario C, Kadiri A, Cavalli A, Berrada J, Zro K, Sebbar G, Colaianni ML, Parisi A, Elia G, Buonavoglia C, Malik J, Decaro N, 2016. Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco. Infect Genet Evol, 41, 201-06.

Bastianello SS, 1981. Canine parvovirus myocarditis: clinical signs and pathological lesions encountered in natural cases. J S Afr Vet Assoc, 52(2), 105-08.

Berkin Ş, Milli Ü, Urman HK, 1981. Türkiye'de köpeklerde parvoviral enteritis'ler. AÜ Vet Fak Derg, 28 (1-4), 36-49.

Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajıma M, 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. Infect Immun, 1(5), 503-08.

Blanco BH, López FC, 2015. Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials. Vet Microbiol, 180, 1-9.

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L, 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. Journal of General Virology, 82, 3021-25.

Castro TX, Miranda SC, Labarthe NV, Silva LE, Cubel Garcia RCN, 2007. Clinical and epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995 – 2004. Arq Bras Med Vet Zootec, 59, 333-39.

Cavalli A, Desario C, Kusi I, Mari V, Lorusso E, Cirone F, Kumbe I, Colaianni ML, Buonavoglia D, Decaro N, 2014. Detection and genetic characterization of canine parvovirus and canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania. J Vet Diagn Invest, 26(4), 563-66.

Chang SF, Sgro JY, Parrish CR, 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and haemagglutination properties. J Virol, 66(12), 6858-67.

Chollom SC, Fyaktu EJ, Okwori AEJ, Agada GOA, Hashimu G, Akele RY, Voumangai EI, Dashe T, Egah DZ, 2013. Molecular detection of canine parvovirus in Jos, Nigeria. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 5(2), 57-59.

Cotmore SF, McKenna MA, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Venermo MS, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ, 2014. The family parvoviridae. Arch Virol, 159(5), 1239-47.

Cotmore SF, Tattersall P, 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. Adv Virus Res, 33, 91-174.

Cotmore SF, Tattersall P, 1996. Parvovirus DNA replication, in: DNA replication in eukaryoric cells, DePamphilis ML, 31 th ed. Amerika: Cold spring harbor labotatory press, p. 799-802.

De Ybanez RR, Vela C, Cortes E, Simarro I, Casal JI, 1995. Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. Vet Rec, 136, 174-5.

Decaro N, Buonavoglia C, 2012. Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Veterinary Microbiology, 155, 1-12.

Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Davis C, Thompson G, Truyen U, Buonavoglia C, 2007. The study of molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. Emerg Infect Dis, 13(8),1222-24.

Decaro N, Desario C, Beall MJ, Cavalli A, Campolo M, DiMarco AA, Amorisco F, Colaianni ML, Buonavoglia C, 2010. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. Vet J, 184, 373-75.

Decaro N, Desario C, Billi M, Lorusso E, Colaianni ML, Colao V, Elia G, Ventrella G, Kusi I, Bo S, Buonavoglia C, 2013. Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. Vet J, 198, 504-07.

Decaro N, Desario C, Billi M, Mari V, Elia G, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C, 2011. Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs. Vet J, 187, 195-99.

Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C, 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. New Microbiol, 31, 125-30.

Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Trani LD, Buonavoglia C, 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. Virology, 385, 5-10.

Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Desario C, Camero M, 2006. First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. J Vet Med B, 53,468-72.

Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Di Trani L, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavogli C, 2005. Real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. Veterinary Microbiology, 105, 19-28

Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C, 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?. J Virol Methods, 126, 179-85.

Esfandiari J, Klingeborn B, 2000. A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. J Vet Med, 47, 145-53.

Filipov C, Decaro N, Desario C, Amorisco F, Sciarretta R, Buonavoglia C, 2011. Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria. Vet Diagn Invest, 23, 152-54.

Gisilanbe MJ, Okuwa OA, Joseph ZN, Udo UJ, 2005. Risk factors associated with canine parvovirus enteritis in vom and environs. Animal research international, 2, 366-68.

Goddard A, Leisewitz AL, 2010. Canine parvovirus. Vet Clin Small Anim, 40, 1041-53.

Haligür M, Özmen Ö, Sezer K, Sahinduran S, 2009. Clinical, pathological and ımmunohistochemical findings in diarrheic dogs and evaluation of canine parvoviral and coronaviral enteritis. J Anim Vet Adv, 8(4), 720-25.

Hirasawa T, Yono K, Mikazuki K, 1996. Detection and genomic analysis of canine parvovirus by the polymerase chain reaction. J Vet Med B, 43, 545-54.

Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki JT, 2007. Ocurrence of canine parvovirus type-2c in the United States. J Vet Diagn Invest, 19 (5), 535-39.

Houston DM, Ribble CS, Head LL, 1996. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). J Am Vet Med Assoc, 208(4), 542-46.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2013. Rationalization and extension of the taxonomy of the family *Parvoviridae*, Erişim tarihi 29 Ocak 2017. Erişim adresi, http://www.ictvonline.org/proposals/2013.001a-aaaV.A.v4.Parvoviridae.pdf.

Izzo MM1, Kirkland PD, Gu X, Lele Y, Gunn AA, House JK, 2012. Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavirus and coronavirus in calf faeces in Australia. Aust Vet J, 90(4), 122-29.

Järplid B, Johansson H, Carmichael LE, 1996. A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). J Vet Diagn Invest, 8, 484-87.

Johnson N, 2014. The role of animals emerging viral disease, UK, Academic Press Elsevier, p.39-55.

Kapil S, Cooper E, Lame C, Brandy M, Grunt K, Johnson W, Campbell G, Johnson B, 2007. Canine parvovirus type 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006–2007. J Clin Microbiol, 45(12), 4044-47.

Kaya E, Akata I, Bakırcı S, Dereli D, Küçükgüven E, Yılmaz İ, 2014. İmmünokromatografik kart testlerin çalışma prensibi ve üretim teknikleri. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 16(3), 46-54.

Kumar V, Pal H, Kumar P, Singh H, Sharma H, Wadhawan VM, 2015. Canine parvovirus enteritis in a pup. AVAS, 2(5), 132- 34.

Lamm CG, Rezabek GB, 2008. Parvovirus ınfection in domestic companion animals. Vet Clin Small Anim, 38, 837-50.

Macintire DK, Smith-Carr S, 1997. Canine parvovirus part-ıı clinical signs diagnosis and treatment. small animal gastroenterelogy, 19(3), 39.

Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C, 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. J Clin Microbiol, 42(3), 1333-36.

Martella V, Decaro N, Buonavoglia C, 2006. Evolution of CPV-2 and implicance for antigenic/genetic characterization. Virus Genes, 33, 11-13.

Martin SW, Meek AH, Willeberg P, 1994. Veterinay epidemiology. Lowa State University Press, 3 nd ed. Ames, USA.

Martin V, Najbar W, Gueguen S, Grousson D, Eun HM, Lebreux B, Aubert A, 2002. Treatment of canine parvoviral enterit with interferon omega in a placebo controlled challenge trial. Veterinary Microbiology, 89, 115-27.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Slauson DO, 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the ımportance of viremia. Vet Pathol, 22, 60-71.

Miranda C, Carvalheira J, Parrish CR, Thompsona G, 2015. Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. Veterinary Microbiology, 180, 59-64.

Miranda C, Thompson G, 2016. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. Journal of General Virology, 97, 2043-57.

Miranda C, Parrish CR, Thompson G, 2016. Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population. Veterinary Microbiology, 183, 37-42.

Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NH, Huynh LM, Nguyen LT, Nguyen PN, Nguyen PV, Nguyen NP, Akashi H, 2004. A novel antigenic variant of canine Parvo virus from a Vietnamese dog. Arch Virol, 149(11), 2261-69.

Nandi S, Chidri S, Kumar M, Chauhan RS, 2010. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. Research in Veterinary Science, 88, 169-71.

Nandi S, Kumar M, 2010. Canine parvovirus: current perspective. Indian J Virol, 21(1), 31-44.

Nandi S, Kumar M, Mohapatra TK, Ravishankar C, 2013. Emergence of canine parvovirus- 2 variants and its ımpact on vaccination. World Applied Sciences Journal, 23(10), 1366-76.

Ntafis V, Xylouri E, Kalli I, Desario C, Mari V, Decaro N, Buonavoglia C, 2010. Characterization of canine parvovirus 2 variants circulating in Greece. J Vet Diagn Invest, 22, 737-40.

Özkul A, Keleş İ, Karaoğlu T, Çabalar M, Burgu İ, 2002. Detection and rflp analysis of canine parvovirus (CPV) DNA by polymerase chain reacion (PCR) in a dog. Turk J Vet Anim Sci, 26, 1201-203.

Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR, 2006. Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex ınteractions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges. J Virol, 80(17), 8482-92.

Parrısh CR, Aquadro CF, Strassheım ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO, 1991. Rapid antigenic-type replacement and dna sequence evolution of canine parvovirus. J Virol, 65(12), 6544-52.

Parrish CR, 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol, 69, 29-40.

Parrish CR, Aquadro CF, Carmichael LE, 1988a. Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink and racoon parvoviruses. Virology, 166(2), 293-307.

Parrish CR, Burtonboy G, Carmıchael LE, 1988b. Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus. Vırology, 163, 230-32.

Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL, 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by PCR. Vet Microbiol, 75(2),127-33.

Perez R, Francia L, Romero V, Maya L, Lopez I, Hernandez M, 2007. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. Vet Microbiol, 124(1-2), 147-52.

Pinto LD, Streck AF, Gonçalves KR, Souza CK, Corbellini ÂO, Corbellini LG, Canal CW, 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. Virus Research, 165, 29-33.

Pollock RV, 1984. The parvoviruses. I. Feline panleukopenia virus and mink enteritis virus. Compend Contin Educ Pract Vet, 6(3), 227-41.

Pollock RVH, Coyne MJ, 1993. Canine parvovirus. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 23 (3), 555-68.

Prittie J, 2004.Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. J Vet Emerg Crit Care, 14(3), 167-76.

Proksch AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K, 2015. Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. Vet J, 204(3), 304-08.

Reed AP, Jones EV, Mıller TJ, 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. J Virol, 62(1), 266-76.

Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, Ratcliffe S, Jenkins M, Appleton H, Gallimore CI, Gray JJ, Brown DW, 2003. Evaluation of a commercial ELISA for detecting norwalk-like virus antigen in faeces. J Clin Virol, 26(1), 109-15.

Sakulwira K, Oraveerakul K, Poovorawan Y, 2001. Detection and genotyping of canine parvovirus in enteritic dogs by PCR and RFLP. Science Asia, 27, 143-47.

Sakulwira K, Vanapongtipagorn P, Theamboonlers A, Oraveerakul K, Poovorawan Y, 2003. Prevalence of canine coronavirus and parvovirus infections in dogs with gastroenteritis in Thailand. Vet Med-Czech, 48, 163-67.

Savi J, Minakshi P, Prasad G, 2009. Genotyping of field strain of canine parvovirus in Haryana using PCR and RFPL. Indian J Anim Sci, 79(10), 971-73.

Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel HJ, Neiger R, 2009. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest, 21, 344-45.

Schoeman JP, Goddard A, Leisewitz AL, 2013. Biomarkers in canine parvovirus enteritis. N Z Vet J, 61(4), 217-22.

Sevindik E, Abacı ZT, 2013. Nested PCR ve kullanım alanları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 6(2), 22-26.

Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. PNAS, 102(2), 379-84.

Silva MMO, Castro TX, Costa EM, Trancoso TAL, Mendes-de-Almeida F, Labarthe NV, Garcia RCNC, 2013. Comparison of three laboratorial tests for diagnosis of canine parvovirus infection. Arq Bras Med Vet Zootec, 65(1), 149-52.

Smith-Carr S, Macintire DK, Swango LJ, 1997. Canine parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination. Compend Contin Educ Pract Vet, 19(2), 125–33.

Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U, 2001. Parvovirus ınfections in wild carnivores. J Wildl Dis, 37(3), 594-607.

Steinel A, Venter EH, Van Vuuren M, Truyen U, 1998. Antigenic and genetic analysis of canine parvovirus in Southern Africa. Onderstepoort J Vet Res, 65(4), 239-42.

Stuetzer B, Hartmann K, 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. The Veterinary Journal, 201, 150-55.

Şahna KC, Gencay A, Atalay O, 2008.Viral aetiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: presence of mixed infections. Revue Méd Vét, 159(6), 345-47.

Timurkan MÖ, Oğuzoğlu TÇ, 2015. Molecular characterization of canine parvovirus (CPV) infection in dogs in Turkey. Vet Ital, 51 (1), 39-44.

Tinky SS, Ambily R, Nair SR, Mini M, 2015. Utility of a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compared with polymerase chain reaction. Veterinary World, 8(4), 523-26.

Truyen U, 1999. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol, 69, 47-50.

Truyen U, Parrısh CR, 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. J Virol, 66(9) ,5399-5408.

Truyen U, Steinel A, Bruckner L, Lutz H, Mostl K, 2000. Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria And Germany. Schweiz Arch Tierheilkd, 142(3),115-19.

Tunca R, Toplu N, 2007. Doğal enfekte köpek parvovirus enfeksiyonunda patolojik bulgular ve viral antijenin floresan antikor tekniği ile demonstrasyonu. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 54, 55-59.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR, 2003. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif, 36, 165-75.

Vieira MJ, Silva E, Oliveira J, Vieira AL, Decaro N, Desario C, Muller A, Carvalheira J, Buonavoglia C, Thompson G, 2008. Canine parvovirus 2c infection in Central Portugal. J Vet Diagn Invest, 20(4), 488-91.

Vural SA, Alcıgır G, 2011. Histopathological and immunohistological findings in canine parvoviral infection: diagnosis application. Revue Med Vet, 162(2), 59-64.

Wang D, Yuan W, Davis I, Parrish CR, 1998. Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. Virology, 240(2), 273-81.

Yeşilbag K, Yilmaz Z, Özkul A, Pratelli A, 2007. Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. Vet Rec, 161, 169-70.

Yılmaz Z, Şentürk S, 2007. Characterisation of lipid profiles in dogs with parvoviral enterit. Journal of Small Animal Practice, 48, 643-50.

Yılmaz Z, Pratelli A, Torun S, 2005. Distribution of antigen types of canine parvovirus type 2 in dogs with hemorrhagic enteritis in Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 29, 1073-76.

7.EKLER

EK A: Etik Kurul Belgeleri

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

Toplantı Tarihi	30.10.2013	Toplantı Sayısı	2013/12	Karar Sayısı	2013/050

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK tarafından sunulan **"Canine Parvo Virus Enfeksiyonlarının Teşhisinde Rapid Test, Elisa ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması"** başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.

Bu araştırmada Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dahiliye Kliniği'ne ishal şikayeti ile getirilen ve Konya Büyükşehir Belediyesi Hayvan Barınağından aynı klinik semptomları gösteren köpeklerden toplanacak gaita ya da swap örneklerinde Canine Parvovirus (CPV) antijen varlığının Rapid test, ELISA ve PCR testleri ile inceleneceği belirtilmektedir. Bu çalışmanın kliniklere getirilen 100 adet köpekte yapılacağı bildirilmektedir.

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

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

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

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

Toplantı Tarihi	09.03.2017	Toplantı Sayısı	2017/03	Karar Sayısı	2017/22

S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK tarafından sunulan ve 30.10.2013 tarihli ve 2013/050 karar sayılı etik kurul onayı verilmiş olan "*Canine Parvovirus Enfeksiyonlarının Teşhisinde Rapid Test, ELISA ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması*" isimli doktora tez projesinin jüri ortak raporu doğrultusunda isminin "*Canine Parvovirus Enfeksiyonlarının Teşhisinde PCR, ELISA ve Hızlı Testin Karşılaştırılması*" olarak değiştirilmesi talebi değerlendirilmiştir.

Başvurunun ve değişikliğin **"Uygun olduğuna"** oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Oya BULUT Başkan	Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. İbrahim AYDIN Üye	Doç. Dr. Ayşe ER Raportör Üye

Doç. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ Üye	Gökhan KILIÇ Konya Doğayı ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi	Gökhan GÜLER Sivil Üye

EK B: Tezden Üretilmiş Yayınlar

- Irmak DİK, Atilla ŞİMŞEK. Comparative Diagnosis of Canine Parvovirus with Methods of Rapid Test and ELISA. "5th Animal Health and Veterinary Medicine Congress" 26-27 Eylül 2016, Valencia/İspanya (Sözlü Bildiri).
- Irmak DİK, Atilla ŞİMŞEK. Detection of Canine Parvovirus Type 2 by PCR in Konya. 6th European Congress of Virology (ECV), 19-22 Ekim 2016, Hamburg/Almanya (Poster Bildiri).

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Isparta'da doğdu. 2002 yılında İlköğretimini Isparta Nazmiye Demirel İlköğretim okulunda bitirdi. 2004 yılında Lise öğrenimini Isparta Gazi Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında başladığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 02.07.2010 tarihinde mezun oldu. Şubat 2011 tarihinde doktora eğitimine başladığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda 2012 yılından bu yana Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evlidir.