TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE EVCİL KEDİLERDE FELİNE CORONAVİRUS ENFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hümay AKIN İLERİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

2013- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DE EVCİL KEDİLERDE FELİNE CORONAVİRUS ENFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Hümay AKIN İLERİ

VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

2013- ANKARA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay		ii
İçindekiler		iii
Önsöz		vi
Simgeler ve Kısaltmalar		viii
Şekiller		xi
Çizelgeler		xii
1. GİRİŞ		**1**
1.1.	Genel Bilgiler	1
1.2.	Literatür	2
1.2.1	Etiyoloji	2
1.2.1.1.	Taksonomi	2
1.2.1.2.	Morfoloji Ve Genom Yapısı	6
1.2.1.3.	Coronaviridae Ailesi Viral Proteinleri	8
1.2.1.3.1.	Spike (S) Proteini	8
1.2.1.3.2.	Envelope (E) Proteini	9
1.2.1.3.3.	Matriks (M) Proteini	10
1.2.1.3.4.	Nükleokapsit (N) Proteini	10
1.2.1.3.5.	Hemagglütinin Esteraz (HE) Proteini	10
1.2.1.3.6.	Yapısal Olmayan Viral Proteinler	11
1.2.1.4.	Viral Replikasyon	11
1.3.	Klinik Bulgular ve Patogenez	14
1.3.1.	Feline Coronavirus enfeksiyonu	14
1.3.1.1.	Feline Enterik Coronavirus (FECV) Enfeksiyonu	15
1.3.1.2.	Feline Enfeksiyöz Peritonitis Virus (FIPV) Enfeksiyonu	16
1.4.	İmmunoloji	21
1.4.1.	Pasif immunite	21
1.4.2.	Aktif immunite	21
1.4.2.1.	Hücresel immunite	21
1.4.2.2.	Humoral immunite	22
1.5.	FCoV Enfeksiyonlarının Tanısı	24
1.5.1.	Nekropsi	24
1.5.2.	Viral Tanı	25
1.5.2.1.	Virus İzolasyonu	25

1.5.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler 25
1.5.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Dizin Analizi 26
1.5.3. Serolojik Tanı 27
1.5.3.1. ELISA 27
1.5.3.2. Virus Nötralizasyon Testi 28
1.5.4. Hematolojik Bulgular 28

2. GEREÇ VE YÖNTEM 30

2.1. Gereç 30
2.1.1. Örneklenen Hayvanlar 30
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler 33
2.1.2.1. Antikor ELISA Kiti 33
2.2. Yöntem 33
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması 33
2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması 33
2.2.1.1.1. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması 33
2.2.1.1.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması 33
2.2.1.1.3. Serum Örneklerinin Hazırlanması 34
2.2.1.2. Rektal süruntü Örneklerinin Hazırlanması 34
2.2.2. Moleküler Teşhis Ve Karakterizasyon 34
2.2.2.1. Viral Nükleik Asitin Hazırlanması ve RNA Ekstraksiyonu 35
2.2.2.2. Viral RNA'nın Reverz Transkripsiyonu (RT) 35
2.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 36
2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Görüntülenmesi 38
2.2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 39
2.2.2.6. Dizin Analizi 39
2.2.2.7. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi 40
2.2.2.8. Filogenetik Değerlendirme 41
2.2.3. Serolojik Teşhis 42
2.2.3.1. ELISA 42

3. BULGULAR 43

3.1. Virolojik Bulgular 43
3.1.1. RT-PCR Bulguları 43
3.1.2. PCR Sonuçları ve Bireysel Verilerin (yaş, barınma, vb) Değerlendirilmesi 48
3.1.3. Dizin Analizi ve Filogenetik Değerlendirme 49

3.1.4. Dizin Analizi ve Filogenetik Verileri Elde Edilen Hayvanlara İlişkin Serolojik Veriler 56
3.2. Serolojik Bulgular 57
3.2.1. ELISA sonuçları 57
3.3. RT-PCR ve ELISA sonuçlarının beraber değerlendirilmesi 58

4. TARTIŞMA 60

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 70

ÖZET 72

SUMMARY 73

KAYNAKLAR 74

EKLER

EK-1 81

EK-2 82

EK-3 89

ÖZGEÇMİŞ 95

ÖNSÖZ

Ülkemizde pet hayvancılığının giderek artan önemiyle kedi besleme hayatımızda daha geniş yer almaya başlamış, aynı zamanda kedilerde görülebilen önemli viral etkenlerden olan Feline Corona Virus (FCoV) enfeksiyonları da artan insidensi sebebiyle önem kazanmıştır. Gerek hayvan sağlığı açısından enfeksiyonun durumunun aydınlatılması amacıyla yapılacak taramalarla aşı programlarının oluşturulmasında ve gerekse klinisyen veteriner hekimlere tanısal anlamda destek olabilmek amacıyla bu enfeksiyöz virusun tespiti ve biyotiplerinin [(Feline Enterik Corona Virus (FECV) ve Feline İnfeksiyöz Peritonitis Virus (FIPV)] ayrımı oldukça anlamlı hale gelmiştir. Özellikle FIPV enfeksiyonu; klinisyenleri ve kedi sahiplerini ilerleyici semptomları ve kötü prognozu sebebiyle yakından ilgilendirmekte, ölümle sonuçlanan klinik gelişim nedeniyle de hayvan sağlığını direkt olarak etkilemektedir.

Nükleik asit olarak RNA taşıyan tüm viruslar, proof-reading mekanizmasının eksikliğinden dolayı mutasyonlara fazlasıyla açıktırlar. *Coronaviridae* ailesi hemen hemen tüm hayvan türlerinde farklı karakterde hastalık yapabilme yeteneğine sahip, RNA özellikli genomu sayesinde antijenik shift ve drift mekanizmalarını hızlı ve etkin olarak kullanarak mutasyona uğrayabilen viruslara sahiptir. Aile içerisinde yer alan feline coronaviruslar da patojenitelerini bu yolla arttırabilmektedirler. Örneğin kedilerde basit enteritis enfeksiyonuna neden olan FECV'lar bağırsak epiteline affinite duyarken, geçirdiği mutasyonlar sonucu makrofajlara affinite duymaya başlayarak ölümcül seyreden FIP enfeksiyonuna da sebep olabilirler.

Bu çalışmada; FCoV enfeksiyonlarının hem serolojik hem de 3' UTR ve M gen bölgesi hedef alınarak uygulanan RT-PCR ve sekans analizi kullanılarak moleküler

temelli araştırılması ve bu sayede tüm dünyada evcil ve yaban hayattaki kedigillerde yaygın olarak görülen hastalığın; Türkiye'deki sağlıklı görünümlü, ishal semptomlu ve klinik olarak FIP tanısı konulmuş evcil kedi populasyonlarındaki epidemiyolojik durumunun aydınlatılması konu edinilmiştir. Ayrıca saptanan bazı FCoV'ların dizin analizleri yapılarak moleküler karakterizasyonlarına ait bulgular da elde edilmiştir.

Bu çalışma süresince Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nın tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan, Viroloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Prof. Dr. Yılmaz AKÇA'ya; Viroloji Anabilim Dalı eski başkanı Prof. Dr. İbrahim BURGU'ya, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Doç. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve desteğini hiç esirgemeyen ve eleştirileri hep yol gösterici olan Doç. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI'ya, zorlukların altından beraber kalktığımız birlikte çalıştığım tüm doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, her zaman destek, anlayış ve koşulsuz sevgileri için aileme ve çalışma süresince tüm kahrımı çeken eşim Evren İLERİ ve çalışma arkadaşım Bige ARKUN'a, kedilerden örnekleme yapmama olanak sağlayan tüm veteriner hekimlere ve hasta sahiplerine ve bizimle olan ve olmayan bütün kedilerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3’UTR	:3’ Untranslated Region
A/G	:Albumin/globulin
ALP	:Alkalen Phosphatase
ALT	:Alanine transaminase
APN	:Aminopeptidaz N
AST	:Aspartate transaminase
BLAST	:Basic Local Alignment Search Tool
Bp	:Base pair
Cdna	:Komplementer DNA
CoV	:Coronavirus
CrFK	:Crandell feline Kidney
DdNTP	:Dideoksinükleotit fosfat
DIC	:Dissemine İntravasküler Koagulasyon
dk	:Dakika
DNA	:Deoksiribonükleikasit
dNTP	:Deoksinükleotit trifosfat
DTCS	:Dye Termination Cycle Sequencing
E	:Envelope
ELISA	:Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FCoV	:Feline Corona Virus
Fcwf-4	:Felis catus whole fetus-4 (),
FECV	:Feline Enterik Corona Virus ()
FECV	:Feline Enterik Coronaviruslar
FeLV	:Feline Leucemia virus

FIP	:Feline İnfeksiyöz Peritonitis
FIPV	:Feline Infectious Peritonitis Virusu
FIV	:Feline Immunodeficiency virus
GAPDH	:Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLDH	:Glutamat-Dehydrogenase
HE	:Hemagglütinin Esteraz
ICTV	:Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IF-γ	:İnterferon gama
Ig	:İmmunglobulin
IL	:İnterleukin
M	:Matrix
MgCl2	:Magnezyum klorür
MHC	:Major histocompatibility complex
ML	:Maksimum-Likelihood
mRNA	:Mesajcı RNA
MSS	:Merkezi sinir sistemi (MSS)
N	:Nükleokapsit
NJ	:Neighbour-Joining
Nm	:Nanometre
OD	:Optik dansite
ORF	:Open Reading Frame
PBS	:Fosfat Tampon Tuz Solusyonu
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
Pmol	:Pikomol
RNA	:Ribonkleik asit
RT-PCR	:Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
S	:Spike
SARS	:Severe acute respiratory syndrome
sn	:Saniye

TAE	:Tris-Asetik Asit-EDTA
TNF-α	:Tümör Nekrotizan Faktör alfa
UV	:Ultraviyolet
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Taksonomik olarak Coronavirusların evrimi 4

Şekil 1.2. Coronavirus grupları 5

Şekil 1.3. Coronavirus evrimi ve olası türler arası geçişler 5

Şekil 1.4. Coronavirus virion yapısının şematik görüntüsü 6

Şekil 1.5. RNA'nın sekonder yapıları 8

Şekil 1.6. FCoV genomu 8

Şekil 1.7. Human Coronavirus replikasyonun şematik görünümü 13

Şekil 3.1. Hedeflenen bölgeye göre yapılan PCR görüntüleri ve pozitif ürünler 44

Şekil 3.2. Aynı hayvana ait kan ve rektal sürüntü örneklerinde saptanan FCoV'ların filogenetik analizi 52

Şekil 3.3. Dizin analizi yapılan FCoV' ların referans sekansa göre aminoasit farklılıkları 53

Şekil 3.4. Dizin analizi yapılan örneklerin filogenetik analizi 54

Şekil 3.5. Aynı hayvana ait kan ve rektal sürüntü örneklerinda saptanan FCoV'ların benzerlik/farklılıkları 55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Nidovirales Takımı ve Alt Aileleri. 3

Çizelge 1.2. Coronavirus Alt Tipleri Ve Etkiledikleri Türler Ve Hastalıklar 4

Çizelge 2.1. Örneklenen Kedilere (n=152) İlişkin Bilgiler 31

Çizelge 2.2. RT-PCR Karışımları ve Bileşenleri 35

Çizelge 2.3. cDNA Sentezi İçin Uygulanan Isı Döngüleri 36

Çizelge 2.4. PCR'da Kullanılan Primer Dizinleri ve Elde Edilen Ürün Büyüklükleri 36

Çizelge 2.5. PCR Karışımının Bileşimi 37

Çizelge 2.6. PCR Karışımına Uygulanan Isı Döngüleri 38

Çizelge 2.7. Dye Termination Cycle Sequencing (DTCS) kit karışımı 40

Çizelge 2.8. DNA Dizinleme Reaksiyon Karışımı 40

Çizelge 3.1. Kan Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 43

Çizelge 3.2. Rektal Sürüntü Örneklerinin RT-PCR Sonuçları 44

Çizelge 3.3. Örneklenen Hayvanların (N=152) Kan ve Rektal Sürüntülerine Uygulanan PCR Sonuçları 45

Çizelge 3.4. Kan GAPDH Geni Pozitifliği Kriter Alınan Kedilerin (N=134) Kan ve Rektal Sürüntü Örneği PCR Sonuçları 46

Çizelge 3.5. Kan GAPDH Geni Pozitifliği Kriter Alınan Kedilere (N=134) Ait Veriler 47

Çizelge 3.6. FCoV 3'UTR Bölgesi Dizin Analizi Yapılan Hayvanların PCR ve ELISA Sonuçları 51

Çizelge 3.7. FCoV RT-PCR Pozitif Örneklerin Antikor Sonuçlarıyla Beraber Değerlendirilmesi 58

1. GİRİŞ

1.1.Genel Bilgiler

Coronaviruslar; insan ve birçok hayvan türünde, sindirim sistemi başta olmak üzere solunum sistemi, dolaşım sistemi gibi farklı sistemlerde enfeksiyon meydana getirebilen ya da jeneralize enfeksiyon sonrası tüm organizmada kalıcı hasarlara neden olabilen enfeksiyöz ajanlardandır.

Kedilerde Feline Coronavirus (FCoV) enfeksiyonu ilk kez 1940'lı yıllarda Nepal'de Bonaduce (1942) tarafından tespit edilmiş, 1963 yılında Holzworth tarafından '*kedilerin önemli bir hastalığı*' olarak tanımlanmıştır. Etken, "virus benzeri partikül" olarak 1971'de Hardy ve ark. (Barnett, 1993) tarafından elektron mikroskobik olarak gösterilmiş; Montali ve Strandberg (1972) ise hastalığın kuru ve yaş formu olarak iki formu olduğunu bildirmiştir.

FCoV'ların dünyadaki evcil ve vahşi kedilerde yaygın olan, sindirim kanalında bulunan apatojen formu olarak tanımlanan Feline Enterik Corona Virus (FECV), organizmayı diğer antijenlere (Feline Herpes Virus, Feline Calicivirus, Feline Leukemia Virus, Feline Immunodeficiency Virus, çeşitli bakteriyel etkenler vb.) karşı duyarlı hale getirmektedir. Hastalığın 1960'lardan sonra artan insidensi ve yeni tanısal tekniklerin gelişmesine paralel olarak; araştırmacılar tarafından Coronavirusların hızlı adaptasyon ve mutasyon kabiliyetleri doğrultusunda FECV'tan mutasyonla (de Groot ve ark., 1987) oluştuğu ortaya konulan, ölümcül sistemik bir enfeksiyon tablosuna neden olan Feline Infectious Peritonitis Virusu (FIPV) tanımlanmışlardır. Bu hastalığın seyrinde birçok faktörün yanı sıra immun sistemin de etkili olduğu bilinmektedir.

Enfeksiyonun semptoma dayalı isminin verilmesine neden olan FIPV'unun coğrafik olarak da değişiklik gösterip göstermediğine yönelik araştırmalara zemin hazırlayan genomik karakterizasyon çalışmaları, hastalığın patogenezine ışık tutucu bilgilerin kazanılmasına yardımcı olmuştur (Lin ve ark., 2009). Günümüzde FCoV'ların tam genomuna yönelik sekanslar tanımlanmıştır (Hsieh ve ark., 2010). Yapılan bu çalışmalarda FCoV'ların genomunda mutasyonlardan oldukça az etkilenen korunaklı bölgeler olduğu saptanmıştır. Ancak FCoV'ta bu bölgelerde oluşacak mutasyonlar; enfeksiyonun seyrinde (patogenetik) veya virusun antijenik karakterinde (filogenetik) değişikliklere sebep olabilmektedir (Lin ve ark., 2009).

1.2 Literatür

1.2.1. Etiyoloji

1.2.1.1. Taksonomi

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Commitee on Taxonomy of Viruses = ICTV) tarafından hazırlanan IX. raporuna göre *Nidovirales* takımı içinde yer alan *Coronaviridae* familyası Coronavirinae ve Torovirinae olmak üzere 2 alt aileden oluşmaktadır. Torovirinae alt ailesi içinde tek ve çift tırnaklıları enfekte edebilen Torovirus cinsi ve bazı balık türlerinde (*Blicca bjoerkna L.*) tespit edilmiş olan Bafinivirus cinsi bulunmaktadır (Murphy, 1994). Coronavirinae alt ailesi içinde ise memeli ve kanatlı türlerini etkileyen viral enfeksiyöz ajanlar bulunmaktadır. Bunlar arasında ekonomik önem arz eden kanatlıların enfeksiyöz bronşitis virusu, domuzların bulaşıcı gastroenteritis virusu, Canine Coronavirus, FCoV, tavşanların miyokarditis etkeni, sıçanların sialodakriadenitis virusu, farelerin hepatitis virusu gibi etkenler bulunmaktadır (Murphy, 1999) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Nidovirales takımı ve alt aileleri.

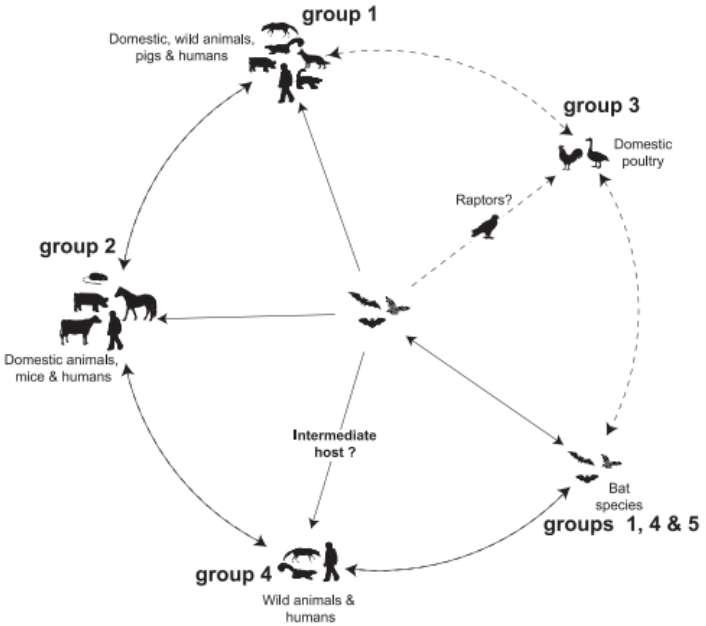
TAKIM	*NİDOVİRALES*
AİLE	*ARTERİVİRİDAE*
CİNS	ARTERİVİRUS
AİLE	*RONİVİRİDAE*
CİNS	OKAVİRUS
AİLE	*CORONAVİRİDAE*
ALT AİLE	CORONAVİRİNAE
CİNS	ALPHACORONAVİRUS
TÜR	ALPHACORONAVİRUS 1
ALT TÜR	Canine Coronavirus
ALT TÜR	**Feline Coronavirus**
Genotip	**Feline coronavirus genotip 1(Enteric)**
Genotip	**Feline coronavirus genotip 2 (Infectious Peritonitis)**
ALT TÜR	Porcine Respiratory coronavirus
ALT TÜR	Transmissible gastroenteritis virus
TÜR	HUMAN CORONAVİRUS 229E
TÜR	HUMAN CORONAVİRUS NL63
TÜR	MİNİOPTERUS BAT CORONAVİRUS 1
TÜR	RHİNOLOPHUS BAT CORONAVİRUS HKU2
TÜR	SCOTOPHİLUS BAT CORONAVİRUS 512
TÜR	PORCİNE EPİDEMİC DİARRHEA VİRUS
CİNS	BETACORONAVİRUS
CİNS	GAMMACORONAVİRUS
ALT AİLE	TOROVİRİNAE
CİNS	TOROVİRUS
CİNS	BAFİNİVİRUS

Coronavirinae alt ailesinde bulunan Coronavirus cinsi ise alfa- (eski Grup 1), beta- (eski Grup 2) ve gammacoronavirus (eski Grup 3) olmak üzere 3 cinse ayrılmaktadır (Çizelge 1.2). Eski sınıflandırmaya göre Grup 1 kendi içinde ikiye ayrılmaktadır (1a,1b). Deltacoronavirus alt cinsi, sadece kanatlıları enfekte eden virusları içermekte olup, dördüncü bir grup olarak ICTV tarafından onaylanmayı beklemektedir.

Çizelge 1.2: Coronavirus alt tipleri ve etkiledikleri türler ve hastalıklar

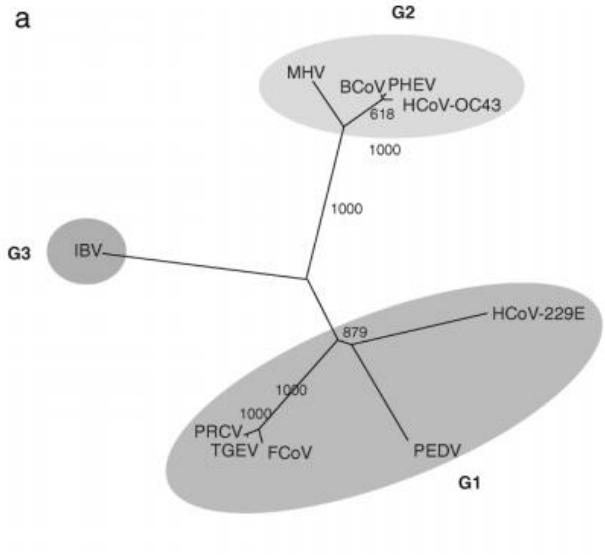
ICTV 2009 RAPORU	HASTALIK	TÜR
Alfa coronavirus	Köpek Coronavirus Hastalığı	Canine
	Feline Enterik Corona Ve Feline Enfeksiyöz Peritonitis	Feline
	Domuzların Solunum Sistemi Hastalığı	Porcine
	Domuzların Bulaşıcı Gastroenteritis Hastalığı	Porcine
Beta coronavirus	Porcine Hemaglütinasyon Yapan Ensefalomeylitis	Porcine
	Bovine Coronavirus	Bovine
	Human OC43	Human
Gama coronavirus	Enfeksiyöz Bronşitis Virus	Avian

Alfacoronaviruslar içerisinde köpek, kedi, domuz, yarasa ve insanların Coronavirus etkenleri bulunmaktadır. Betacoronaviruslar içerisinde fare, sıçan, sığır, at, yarasa ve insanların coronavirus etkenleri yanı sıra SARS virusu ve ilişkili olduğu yarasa, misk kedisi, gelincik benzeri türler ve porsuk coronavirus etkenleri bulunmaktadır. Gammacoronaviruslar içerisinde ise kanatlıların ve balinaların coronavirusları yer almaktadır. Ancak bu cins Coronavirinae alt ailesiyle filogenetik olarak ilişkili olsa da, virion morfolojisi, genom organizasyonu, gen kompozisyonu, replikasyonu veya biyolojik döngüsü bakımından diğer Coronaviruslardan ayrılmaktadır (Murphy, 1994). Yapılan araştırmalar tüm Coronavirus soylarının doğal konaklarının yarasalar olduğunu göstermiştir (Christian and Scotti, 1994) (Şekil 1.1-1.3).

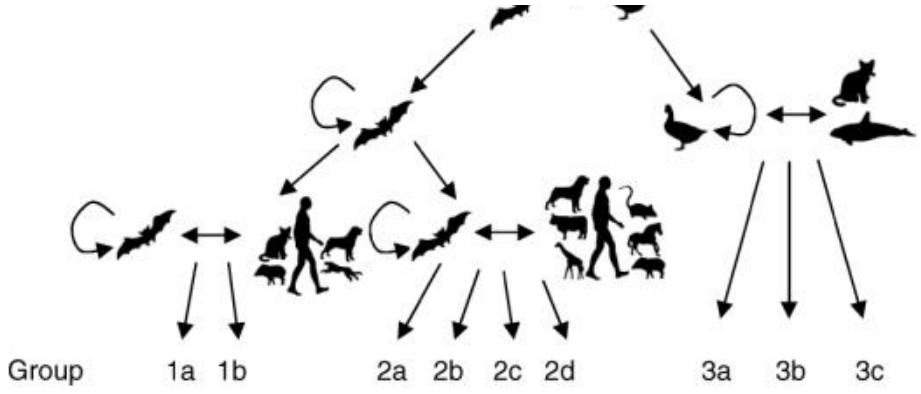


Şekil 1.1: Taksonomik olarak CoV'ların evrimi (Woo ve ark., 2009)

FCoV'lar serotipik olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Bunlardan tip 2 FCoV suşları; S geni analizi yönünden canine suşlarıyla ilişkili, E geninin analizi yönünden ise tip 1 feline suşları ile yakın ilişkili bulunmuştur. Canine ve tip 1 Feline suşları genomlarının 3'UTR bölgelerindeki karşılaştırmalar sayesinde homolog rekombinasyon sonucu tip 2 feline suşlarının ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Vennema ve ark., 1998). Bazı yabani kedilere ait CoV suşları avian suşlarına yakın bulunmuş olup Grup 3 içerisinde klasifiye edilmiş, bunun türler arası evrimi gösterdiği öne sürülmüştür (Woo ve ark., 2009).



Şekil 1.2. Coronavirus grupları (Woo ve ark., 2009)

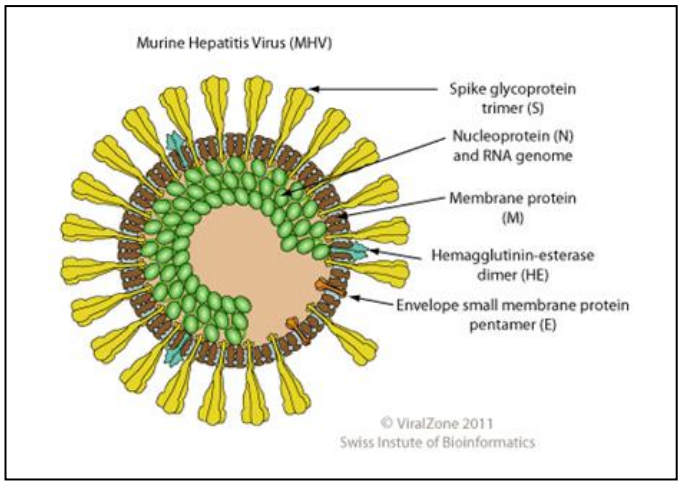


Şekil 1.3. Coronavirus evrimi ve olası türler arası geçişler (Woo ve ark., 2009)

1.2.1.2. Morfoloji Ve Genom Yapısı

Coronavirinae alt ailesindeki tüm viruslar ısı, yağ çözücü, non-iyonik deterjan, formaldehit, oksitleyici ajanlar ve UV'ye duyarlıdırlar. Bu viruslar spesifik intrasellüler membrandan tomurcuklanma sonucu kazanılan lipoprotein tabiatta bir zarla çevrilidirler (Şekil 1.4). Bu alt ailenin tüm üyeleri küre şeklinde olup elektron mikroskobik olarak 60-220 nm büyüklüğe sahiptirler (Thiel, 2007).

Coronavirinae genomu linear, pozitif iplikçikli, kepli ve poliadenile RNA içermektedir. Şu ana kadar bilinen en büyük RNA virusları bu alt ailededir (Thiel, 2007).



Şekil 1.4. Coronavirus virion yapısının şematik görüntüsü (Hulo C. ve ark., 2011)

Coronavirinae genomları 5' ucunda 200-600 baz, 3' ucunda 200-500 baz uzunlukta translate olmayan bölgeler (Untranslated Region -UTR-) ile sınırlıdır. Bu bölgeler ve internal kodlama dizinleri, genom replikasyonu ve kapsidasyondan sorumludur. Alt ailedeki virusların hepsinde açık okunabilir bölge (Open Reading Frame -ORF-) ve bu bölgede tüm üyelerde aynı sırayla: ORF1a ve 1b (Replikaz), S (Spike), E (Envelope), M (Matrix), N

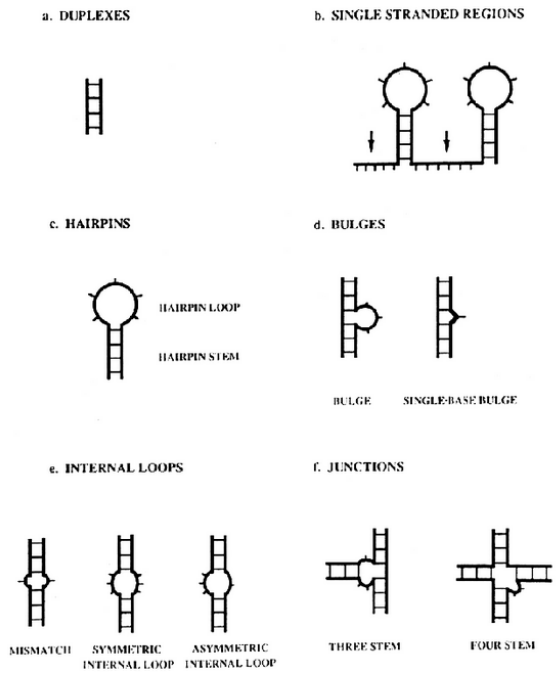
(Nükleokapsit) proteinleri bulunmaktadır (Thiel, 2007).

ORF1b'den itibaren 5' → 3' yönünde bulunan yapısal proteinlerin aralarında en az sekiz aksesuvar (yardımcı) protein bulunmaktadır (Thiel, 2007). Bunların doğal enfeksiyon sırasında viral replikasyondan sorumlu oldukları ve horizontal gen transferi ile kazanıldıkları bildirilmiş olup, bu proteinlerin yeni tür ve alt türlere adaptasyon sırasında kaybedilmesi ve *in vitro* ortamda bunlara ihtiyaç duyulmaması sebebiyle Coronavirusların evriminde önemli olmadıkları görüşü hakim olmuştur (Murphy ve ark., 1995).

3' Translate Edilmeyen Bölge (Untranslated Region-UTR)

Coronaviruslar genomlarının iki ucunda, genom replikasyonu için gerekli promotorları bulunduran ve 0.2-0.5 kb (5'UTR) ile 0.3-0.5 kb (3'UTR) arasında değişen translate olmayan bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgelerdeki birincil yapı, alt gruplar arasında zayıf olarak korunmuş haldedir.

Coronavirusların 3'UTR bölgesi yaklaşık 55 nükleotidlik korunmuş pseudoknot yapısına sahiptir (Şekil 1.5). Bu yapı viral genomun replikasyonu için gereklidir (Williams ve ark., 1999).



:Şekil 1.5: RNA'nın sekonder yapıları (Chastain ve Tinoco, 1991)

1.2.1.3. Coronaviridae Ailesi Viral Proteinleri

Coronaviridae alt ailesinde sırasıyla spike (S), envelope (E), matriks (M), nükleokapsit (N) ve hemaglütinin esteraz (HE) yapısal proteinleri bulunmaktadır (Şekil 1.6) (Murphy, 1994).



Şekil 1.6: FCoV genomu. Yapısal proteinler koyu gri, yapısal olmayanlar açık gri olarak gösterilmiştir (Brown ve ark., 2009).

1.2.1.3.1 Spike (S) Proteini

Coronaviridae üyelerinin S proteini 1200-1600 aminoasit içeren tip I membran glikoproteinidir. Saplı topuz formda, 12-24 nm uzunlukta, elektron mikroskobik olarak taç şeklinde çıkıntılar halinde görünen S proteini, Coronavirus ailesine, "Corona=Taç" adının verilmesinden sorumludur. Bu

protein virusun tür ve doku spesifitesini belirlemektedir (Haijema ve ark., 2003; Rottier ve ark., 2005). S proteini yüksek oranda N-glikoziledir. Konakçı hücreye girişte görevli olup, hücresel membrana bağlanan reseptördür ve sınıf I füzyon proteinlerinin özelliklerini taşımaktadır. S proteinindeki yapısal, fonksiyonel dizin benzerlikleri Coronaviridae ailesindeki, Toro-, Bafini-, ve daha az olarak da Coronavirusların aynı evrimsel kökenden geldiğini düşündürmektedir (Murphy, 1994).

Coronaviridae S proteini virion biogenezi sırasında proteolitik çatallanma sonucu S1 ve S2 alt ünitelerine ayrılarak homotrimerler oluşturur. Homotrimerlerin distal kısmı S1 alt ünitelerinden oluşup reseptör bağlanma noktaları olarak görev yaparken, S2 alt ünitelerinin karboksi uçları virion membranına bağlanmıştır. Virionda S1 alt ünitesinin N ucundaki altılı tekrarlayan bölge olan HR1, internal füzyon peptidinin aşağısına doğru iken; N ucundaki diğer altılı tekrarlayan bölge olan HR2, transmembran domaininin yukarısına doğrudur. S2 proteininin altılı tekrarlayan bölgeleri hücreye giriş sırasında bir takım yapısal değişikliklere uğrayarak membran füzyonunu gerçekleştirirler. S proteini, konakçıda hücresel koşullu immun yanıtı indükleyerek antikor (özellikle nötralizan) oluşumundan sorumludur (Thiel, 2007).

1.2.1.3.2. Envelope (E) Proteini

Coronaviridae ailesi üyelerinden sadece Coronavirus cinsinde tespit edilmiş olan E proteini; küçük ve pentamerik yapıdaki bir integral membran proteinidir. İyon değişimi ve/veya membran geçirgenliğini arttıran (viroporin) aktivitelerine sahiptir. Virion başına 20 kopya sayısıyla minör yapısal bileşen olup, viral morfogenezde rol aldığı düşünülmektedir (Thiel, 2007). Ayrıca SARS virusunda virulansı etkilediği de bildirilmiştir (Frenkel ve ark. 1989; Junge ve Liebermann, 1990).

1.2.1.3.3. Matriks (M) Proteini

Coronaviridae ailesinde Matriks (M) proteini integral tip III membran proteini yapısındadır ve enfekte hücrede en fazla bulunan proteindir. M proteininin Corona-, Toro- ve Bafinivirus alt cinsleri için sekansları ve yapısı farklılık göstermektedir. Bu viruslarda M proteini membranı üç kez sararken, virionun içine ve dışına doğru endo- ve ektodomainler oluşturarak virionun stabil bir yapıda kalmasını sağlar. Elektron mikroskopide Coronavirus zarının kalın görünmesinin sebebi de endo- ve ektodomainin tabaka şeklindeki görüntüsüdür. M proteini kapsitin oluşumunda görev almaktadır (Thiel, 2007).

1.2.1.3.4. Nükleokapsit (N) Proteini

Coronaviridae ailesi nükleokapsit (N) proteini oldukça basit RNA bağlayan fosfoprotein yapıdadır. Kapsitlenme ve genomun paketlenmesinde görevlidir. Ancak *Coronavirinae* alt ailesinde bu görevlerinin yanı sıra RNA sentez ve translasyonunda rol aldığı, RNA chaperone aktivitesi gösterdiği ve Interferon Tip I antogonisti olarak davrandığı bilinmektedir (Thiel, 2007; Murphy, 1994)

1.2.1.3.5. Hemagglütinin Esteraz (HE) Proteini

Betacoronavirusların bazılarında ve Toroviruslarda hemagglütinin esteraz (HE) adlı ikinci bir homodimerik yapıda tip I membran glikoproteini bulunmaktadır. Görevi, reversible membran ataçmanıdır. Nidovirales aileleri arasındaki Corona ve Toroviruslardaki HE protein genleri birbirlerine daha fazla (%30) benzerlik gösterirlerken, aynı viruslar için S ve M protein genlerinin benzerlikleri daha az oranda bulunmuştur. Bu durum, anılan aileler arasında daha yakın bir ilişkiyi, yani ortak atayı göstermektedir (Thiel, 2007).

Corona ve Torovirus soylarının S ve M proteinlerini ortak atalarından kazandığı; HE proteinini ise Influenza C virusunun füzyon proteinine olan benzerliği tespit edildiğinden bu proteinin aynı konağın Corona/Toro virus ve Influenza C virusu ile miks enfeksiyonunu takiben sonradan kazanıldığı öne sürülmüştür (Murphy, 1999).

1.2.1.3.6. Yapısal Olmayan Viral Proteinler

Bu proteinlerin görevleri tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber viral replikasyonda, tür ve organ spesifitesinde rol aldıkları düşünülmektedir (Siddell, 1995).

1.2.1.4. Viral Replikasyon

Coronaviridae ailesindeki etkenlerin replikasyonu, enfekte hücrenin sitoplazmasında meydana gelir. FCoV'un konakçı hücreye girişinde hücresel reseptör glikoproteini olarak kazanılan S proteini önemli rol oynar. Virusun S proteini hücrenin plazma membranındaki Aminopeptidaz N (APN) reseptörüne affinite duyar, virus bu reseptöre tutunur. Virus zarı ile hücre plazma membranının füzyonu sonrası virusun clathrin ve caveole bağımsız endositozunu takiben viral genom hücre içerisine alınır (Şekil 1.7) (Van Hamme ve ark., 2008).

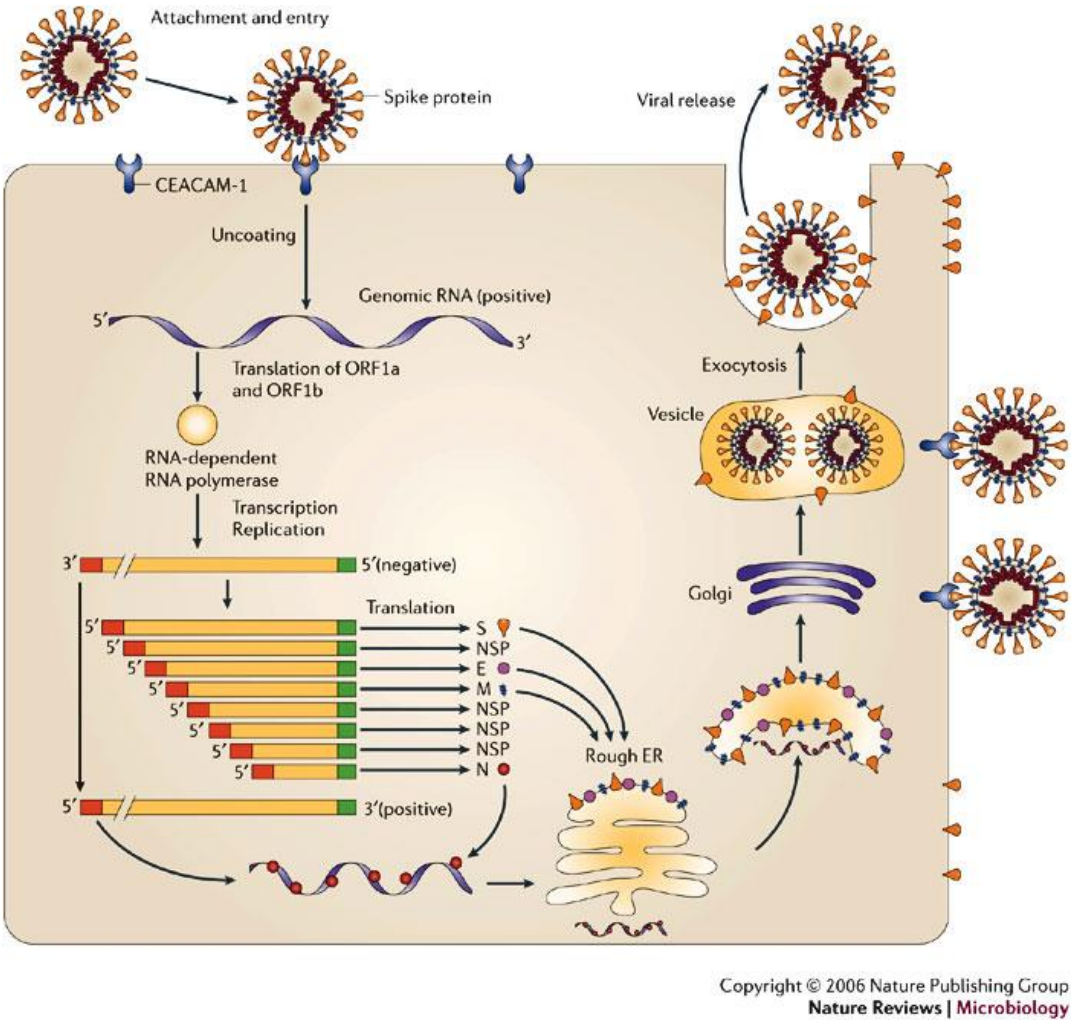
Genomik RNA'nın, mRNA olarak görev yapmasıyla önce polimeraz sentezlenir. Viral RNA bağımlı RNA polimeraz vasıtasıyla pozitif iplikten negatif iplikçik kodlanır. RNA polimeraz, tam boydaki komplementer negatif iplikçikli RNA'yı ve 3' koterminal nested setli özel subgenomik mRNA'ları transkribe eder. Bu nested setler farklı uzunluktaki 5-7 adet üst üste gelen

mRNA'dan oluşup 3' uçları ve 5' lider sekansları ortak dizinler oluştururlar. Bunlar lider dizin mekanizmasını kullanan devamlı olmayan transkripsiyon ürünleridir. Nested set mRNA'larla beraber bunların komplementeri subgenomik negatif iplikçikli RNA'ların da enfekte hücrelerde bulunması henüz tam anlamıyla açıklanamamıştır. Bu subgenomik RNA'ların 5' ve 3' terminal dizinleri genomik RNA ile benzer olup, bunların replikonlar olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir (Thiel, 2007).

Genomun 5' ucunda kısmi olarak üst üste gelmiş 2 büyük ORF bulunur. ORF 1a ve 1b olarak adlandırılan bu dizinler birleşerek replikaz genini oluşturur ve replikasyon kompleksinde rol oynayan yapısal olmayan proteinlerin ve birçok enzimin kodlanması, kompozisyonu ve fonksiyonunda görev alır. Virion RNA'sı ORF1a ve ORF1b için mRNA olarak görev yapar. Ancak ORF1b ekspresyonu, programlanmış bir ribozomal frame-shifting (çerçevesel kayma) sonucunda gerçekleşir. ORF1a'dan poliprotein (pp) 1a sentezlenir. Ancak vakaların %20-30'unda ribozomlar ORF1a sonlanma kodonuna varmadan, ORF1a/1b üstüste gelmiş bölüme kayarak ORF1b sentezine devam eder. Bu frame shifting özel 7 nükleotidlik 'kaygan' dizinde gerçekleşip 3' uca doğru uzayarak poliprotein pp1ab sentezine sebep olur. Oluşan pp1ab, RNA bağımlı RNA polimeraz olarak adlandırılır. Negatif iplikçikli komplementer RNA'nın 3' ucundaki lider sekans, transkripsiyon sonrası keplenerek genomdan ayrılır. Bu lider sekans komplementer sekansa kalıbın 5' ucuna kadar sürecek çoğalma için promoter ve transkripsiyon baskılayıcı olarak çalışan intergenik sekanslardan bağlanır. Böylece nested set içindeki bir sonraki küçük mRNA paylaşılmaz. Sadece bu paylaşılmayan gen bölgesi translate olur ve bu strateji birçok viral proteinin istenilen miktarda üretilmesini sağlar (Thiel, 2007).

Coronavirusların; sentezi, oligomerizasyonu ve birçok zarf glikoproteininin transportu alışılmışın dışında özellik gösterir. Örneğin; bazı Coronavirusların

M proteini, N-bağımlı glikanlar yerine O-bağımlı glikanları içerir. Bu durum proteini endoplazmik retikulumun boşluğuna direkt ilişkilendirir. Virusa ait S proteini konakçı hücrenin endoplazmik retikulumunda sentezlenir ve Golgi kompleksine glikozillenmiş homotrimer olarak transport edilir. Endoplazmik retikulumdaki membran bağımlı polizomlarda translate olan M proteini ise Golgi kompleksinde toplanır. Virionlar plazma membranından değil, endoplazmik retikulumdan tomurcuklanıp, plazma membranına veziküller içerisinde taşınır. Sitoplazma içindeki büyük veziküller içinde toplanan virionlar, bu veziküllerin hücresel plazma membranı ile kaynaşması sonrası ekzositoz ile dışarıya atılırlar ancak bu virusların çoğu, hücrenin dış yüzeyine yapışık halde kalır (Thiel, 2007; Leukert, 2002).



Şekil 1.7. Human Coronavirus replikasyonun şematik görünümü (Bergmann ve ark., 2006)

1.3. Klinik Bulgular ve Patogenez

1.3.1. Feline Coronavirus Enfeksiyonu

FCoV evcil kedilerin yanı sıra aslan, çita, leopar, jaguar, vaşak gibi vahşi kedilerin de dahil olduğu *Felidae* ailesinin birçok üyesinde enfeksiyon meydana getirebilmekte, ayrıca gelinciklerde de benzer hastalık tablosu şekillendirebilmektedir (Evermann ve ark., 1989). FCoV'ların patogenezinde en önemli virulens faktörü makrofajları enfekte edebilme yeteneğidir (Rottier ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar FCoV'ların birden fazla serotipi (serotip 1 ve 2) ve biyotipi/patotipi (FIPV ve FECV) olduğunu ortaya koymuştur.

Serotip ayrımı; nötralizasyon testi yanı sıra S proteini aminoasit dizin analizlerine göre de yapılmıştır (Motokawa ve ark., 1995; Motokawa ve ark., 1996). Serotip 2'nin; FCoV serotip 1 ile Canine coronavirusların rekombinasyonu sonucunda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Herrewegh ve ark., 1998). Serotiplerin hücre kültüründe üreme özellikleri ve Canine Coronavirusa antijenik yakınlıkları birbirinden farklıdır (Pedersen ve ark., 1984). FCoV Serotip 1, canine kökenli antiserumlarla kros nötralizasyon vermezken; Serotip 2 vermektedir. Serotip 1 saha enfeksiyonlarında dominant tip (Vennema ve ark., 1998) iken, FCoV Serotip 2'nin *in vitro* üreme kabiliyeti oluşu, araştırmaların çoğunda bu serotipin kullanılmasına olanak sağlamıştır. FCoV Serotip 2; bağırsak, akciğer ve böbrek epitellerinde bulunan hücre yüzeyi metalloproteazı olan APN'ye affinite duyarken; Serotip 1'in reseptörü henüz belirlenememiştir (Hohdatsu ve ark., 1998). Ancak APN üzerine yapılan birçok çalışma (Kolb ve ark., 1998), belirli bölgelerdeki (özellikle C terminal uçta) mutasyonların türler ve hatta serotipler arası tropizmi bile etkileyebileceğini göstermiştir. Serotiplerin affinite duydukları hücre reseptörleri farklı olsa da (Hohdatsu ve ark., 1998; Tresnan ve ark., 1996), her iki serotipte de hastalık patogenezlerine göre 2 biyotip ya da

patotip bulunur (Pedersen ve ark., 1984):

-Feline enfeksiyöz peritonitis virus (FIPV)

-Feline enterik corona virus (FECV)

1.3.1.1. Feline Enterik Coronavirus (FECV) Enfeksiyonu

Enterik Coronavirus fekal-oral bulaşma ile duyarlı bireylere nakledilir. Genç hayvanlarda 3-4 gün süren ishal ile karakterize iken, daha yaşlı hayvanlarda çoğunlukla asemptomatik olarak seyreder. Etken; kalın bağırsak, ileum ve rektum epiteline affinite duyar (Herrewegh ve ark., 1997) ve bu bölgelerde 18 aya kadar persiste kalarak saçılabilir (Pedersen ve ark., 1981b). Enterik coronaviruslar zayıf virulense sahip olsalar dahi, intestinal kanaldaki epitel hücrelerinde primer replikasyonlarını gerçekleştirebilmektedirler (Rottier ve ark., 2005). Enterik coronaviruslara kan dolaşımında (Meli ve ark., 2004; Vogel ve ark., 2010) ve lenf nodüllerinde rastlanmasına rağmen enfeksiyonun patogenezi sadece sindirim sistemi semptomları ile sınırlı kalmaktadır. Etkene kan dolaşımında rastlanabilmesinin sebebi; etken saçılımının enfekte epitel hücresinin apikal değil basolateral yüzeyinden, yani kan dolaşımına daha yakın bölgeden oluşu şeklinde açıklanmaktadır (Rottier, 1999). Kedilerin etkeni hayatları boyunca sürekli, dönem dönem veya sadece enfeksiyon boyunca saçtığı bildirilmiştir (Pedersen, Allen, ve Lyons, 2008). Bu saçılım karakterinin belirlenmesinde enfekte kedinin immun durumu, oluşan antikorların titresi ve hayvanın yaşı gibi faktörler etkili olsa da, bu fenomende rol oynayan bütün sebepler henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pedersen ve ark., 2008). Bununla birlikte; FECV ile persiste enfekte kedilerde, virusun S proteininde oluşan mutasyonların, virusun immun sistemden kaçabilmesini sağladığı öne sürülmüştür (Herrewegh ve ark., 1997). Bir suş ile enfekte olan kedinin, yaşamı süresince başka bir suş ile de enfekte olması mümkündür. Oluşan reenfeksiyonun virus saçılımına etkisi olduğu düşünülmektedir (Addie ve ark., 2003).

1.3.1.2. Feline Enfeksiyöz Peritonitis Virus (FIPV) Enfeksiyonu

FIP; 1963 yılında Holzworth tarafından 'kedilerin önemli bir hastalığı' olarak tanımlanmıştır (Holzworth, 1963). Etken, "virus benzeri partikül" olarak Hardy ve ark. (1971) tarafından elektron mikroskopik olarak tespit edilmiş, Montali ve Strandberg (1972) ise hastalığın kuru ve yaş olmak üzere iki formu olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalara dayanılarak, FIPV'nun FECV'tan mutasyonla oluştuğu teorisi, ki bu teori "internal mutasyon teorisi" olarak anılır (Vennema ve ark., 1998), bilim çevrelerinde kabul görmektedir. Bu çalışmalarda FECV ile persiste enfekte olan kedilerde, aynı virusun ikincil patotipi olan FIP virusunun mutasyonla oluştuğu, spesifik mutasyonlar bildirilmemekle birlikte bu mutasyonların özellikle viral spike geninde, 3c ve 7b genlerinde oluştuğu tespit edilmiştir (Vennema ve ark., 1998). Bu durum, bir virusun farklı genetik yapıya sahip varyantlarının varlığını açıklayan '*Quasispecies teorisi*' ile uyumludur. İkinci bir hipotez ise, hastalığın klinik seyrinde birçok faktörün yanısıra virulensleri farklı iki farklı virusun sirküle olduğu yönündedir (Dye ve Siddell, 2007).

FIP enfeksiyonunda mutant virusun diğer kedilere bulaşması konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Vennema ve ark. (1998) FIP virusuyla enfekte kedilerin hem FIP virusunu ve hem de FECV saçabildiklerini, FECV'un ise duyarlı kedilerde enfeksiyona neden olarak FIP enfeksiyonu gelişimi için predispozisyon oluşturabildiğini, FIP virusunun ise sağlıklı kedilerde enfeksiyona neden olmadığını ve dolayısıyla '*FIP virusu, kediden kediye bulaşmaz*' görüşünü bildirmelerine karşın; Addie ve ark. (1996) FIP virusunun da duyarlı hayvanlarda enfeksiyona neden olabildiğini bildirmektedirler.

FIPV'nun enterik coronavirusların mutasyona uğrayarak makrofaj tropizmi kazanması sonucu oluştuğu görüşü birçok araştırmacı tarafından

desteklenmiştir (Vennema ve ark., 1998; Rottier ve ark., 2005). Bu mutasyonların sebepleri arasında;

- oHayvanın yaşı,
- oHayvanın ırkı (bazı kedi ırklarında yatkınlık),
- oHayvanın FCoV enfeksiyonlarına karşı immun durumu/antikor titresi,
- oHayvanın FIV, FeLV gibi immunsupresif etkenlerle birlikte enfeksiyonu,
- oHayvanın yaşadığı ortam (çoklu/tekli),
- oHayvanın bulunduğu ortamdaki enterik corona suşu/ yeni suşun girişi,
- oCerrahi girişimler, gebelik gibi stres faktörleri ve
- oMevsim sayılmaktadır.

Etkenin tropizma değişiminin, lenf yumrularında virus replikasyonu sırasında oluşan mutasyon sonucu olduğu düşünülmektedir (Thiel, 2007). Mutant coronaviruslar, aktif kan dolaşımındaki monositleri ve dokulardaki makrofajları enfekte etme yeteneği kazanmaktadırlar. Bu durum daha çok antijenik drift mekanizmasıyla oluşan mutant virusun birçok sistemi etkileyen FIP hastalığını şekillendirmesi ile sonuçlanmaktadır. Enfeksiyonun, insanların deng humması enfeksiyonuna benzer bir immun aracılı patogenez izlediği bildirilmiştir (Halstead, 1979; Halstead ve ark., 1983). Kedinin immun sistemi, enfeksiyonun Kuru (non-effüsiv/paranşimatoz) veya Yaş (effüsiv/non-paranşimatoz) formda seyretmesini belirlemektedir (Murphy, 1999). FIP enfeksiyonunun ölümcül seyretmesi sebebiyle FCoV hakkında yapılan araştırmaların çoğu bu mutant virusa yönelmiştir.

FIP'te inkubasyon süresi deneysel enfeksiyonlarda 2-14 gün arasında olsa da (Pedersen ve ark., 1981a) doğal enfeksiyonlarda bu süre bilinmemektedir (Pedersen, 2009). Hastalığın ilk semptomları; dalgalı ateş, iştahsızlık, kilo kaybı ve durgunluktur. FIP'e yönelik semptomlar ise etkenin hangi dokuları

etkilediği ve formu ile ilişkilidir. Sıklıkla böbrek disfonksiyonu sonrası şekillenen peritonitis, enfeksiyona ismini veren klinik formu geliştirmektedir (Pedersen, 2009).

FIP; antikor ilişkili aşırı duyarlılık reaksiyonu ve antikor bağımlı patojenite artışı (Weiss ve Scott, 1981; Stoddart ve Scott, 1989) yapabilen ender viruslardan biri olarak tanımlanmaktadır. Virusun hücreye girişinden sorumlu APN reseptörü, antijen-antikor kompleksine bağlı patojenite artışından sorumlu değildir (Takano ve ark., 2008). Antikor ilişkili hipersensitivite reaksiyonunda, hücresel immunite yeterli yanıtı oluşturamadan antikor yanıtı gelişir. Hastalığın yaş formunda, enfekte kedilerde bu tip bir yanıt söz konusudur. Yaş form; genellikle 2 yaş altı kedilerde peritoneal ve pleural boşluklarda sıvı toplanmasıyla karakterizedir. Antijen-antikor kompleksinin kılcal damarlarda yoğunlaşması ve buna bağlı olarak bu bölgelerde trombositlerin yığılması sonucu şekillenen Dissemine İntravasküler Koagulasyon (DIC) bu sıvı toplanmasının en önemli nedenidir (Weiss ve Scott, 1981). Peritoneal sıvı toplanmaları palpasyonda ağrısız ve fluktuandır. Perküsyonda sıvı hareketi net şekilde hissedilebilmektedir. Biriken sıvı altın sarısı renkte, berrak veya müsinöz ve bulanık karakterde olabilmektedir. Pleural sıvı birikimine bağlı nefes almada zorluk, hırıltılı solunum, peritoneal sıvı birikimine bağlı erkek hayvanlarda skrotal büyüme bulguları klinik semptomlar arasında yer almaktadır. Yavru kedilerde pleuritis, hepatitis ve bronşitis sonucu ölüm meydana gelmektedir. Hastalıktan etkilenmiş hayvanlarda antijen-antikor kompleksinin eklemlerde de toplanması sonucu synovitis ve topallık görülebilmektedir (Pedersen, 2009). Son yıllardaki bazı çalışmalarda, araştırıcılar vaskulitis bölgelerinde antijen-antikor kompleksinin varlığını tespit edemeyerek (Kipar ve ark., 2005), hastalığın patogenezinde rol alan antijen-antikor komplekslerinden daha farklı olasılıklar üzerinde durmaya başlamışlardır (Takano ve ark., 2011).

Hastalığın kuru formu, genellikle 10 yaş ve üzeri kedilerde çeşitli organlarda pyogranülamatöz lezyonlarla karakterizedir. Bu formun paranşimatöz form olarak da anılmasının sebebi, pleural veya peritoneal dokulardan paranşime doğru ilerleyen lezyonlar gözlenmesidir. Bu formun şekillenmesinde de yine immun sistem etkilidir. Dokulardaki enfekte makrofajlardan salınan kemotaktik faktörler sonucu, enfekte hücreler kedinin hücresel yanıt düzeyine bağlı olarak yangı hücreleri tarafından çevrelenirler (Takano ve ark., 2009). Bu reaksiyon perivasküler bölgelerde yoğunlaşır. Biriken yangı hücreleri lokal doku nekrozuna ve fonksiyonel yetersizliğe neden olur. Bu bölgeler zamanla kronik pyogranülomatoz lezyonlara dönüşerek lokalize olduğu organın görevini yapamamasına ve organ yetmezliğine sebep olmaktadır. Makroskobik olarak organların parenşim dokularında gri-beyaz nodüller görülmektedir.

Abdominal bölgede önce böbrekler ve mezenterik lenf yumruları, daha az olarak da karaciğer ve diğer lenf yumruları etkilenir. Sekum ve kolonun etkilenmesi ceoco-colic lenfadenopatiye yol açabilir. Buna bağlı olarak ortaya çıkan ülseratif kolitis kuru FIP'in tipik bir bulgusudur. Dışkı kanlı ve mukusla kaplı olarak atılabilir.Pleuranın ve akciğerlerin paranşimatöz lezyonlarının ilerlemesi ile perikardın etkilenmesi sonucu kalp krizi şekillenebilir.

Merkezi sinir sistemi (MSS) bulguları 2 yaş altı kedilerde seyreden kuru form FIP'te daha sık görülmektedir (Marioni-Henry ve ark., 2004). Omuriliğin etkilenme düzeyine göre ön ayaklarda hissizlik, inkoordinasyon, aşırı duyarlılık, ataksi ve tremorlar, brachial, trigeminal, fasiyal ve siyatik sinirlerde iletim bozuklukları görülebilir. Beynin choroid ve ependima tabakalarının etkilenmesine bağlı olarak hidrosefalustan, karakter değişikliklerine kadar birçok semptoma rastlanabilir. Cerebellar-vestibular lezyonlar sonucu oluşan nistagmus, kafanın yana yatması, kendi etrafında dönme gibi bulgular şekillenebilmektedir (Holliday, 1971; Marioni-Henry ve ark., 2004; Timmann

ve ark., 2008).

Kuru form FIP'te gözlerde üveitis ve chorioretinitis sonrası irisin renk değiştirmesi enfeksiyonun erken bulguları arasındadır (Slauson ve Finn, 1972). Fibrin, makrofaj ve diğer yangısal hücrelerden kaynaklanan keratik birikimler korneanın arka yüzünde yoğunlaşarak, FIP için karakteristik bir tablo oluşturmaktadır. İristeki granülamatöz lezyonlar ise pupilde şekil değişikliklerine sebep olabilmektedir (Pedersen, 2009). Anhidrozis, miyozis, enoftalmus, pitozis ve heterokromi (iki göz renginin farklı olması) oluşumuna sebep olan ve pupil, üst göz kapağı, fasial ter bezleri ve fasial damarlara giden sempatik liflerde lezyon biçiminde açıklanan "Horner sendromu" (Negrin ve ark., 2010) FIP ile enfekte hayvanlarda görülen önemli bir bulgudur. Bu hastalıkta daha çok tersier göz kapağının kapanması karakteristiktir (Pedersen, 2009). Ayrıca çok yaygın olmamakla birlikte FIP'te papüllü deri lezyonları da rapor edilmiştir (Declercq ve ark., 2008).

FIP'in 5-10 yaş arası kedilerde insidansı düşüktür. Bunun sebebi bu yaş aralığındaki kedilerde hücresel immun yanıtın iyi düzeyde olmasıdır. FIP'li kedilerde bir immun supresyon bulgusu olan lenfopeni karakteristiktir. Enfekte tüm kediler sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı dirençsizdirler. Cerrahi girişimler gibi stres faktörleri de etken-konak arasındaki dengeyi bozarak, FIP'in semptomlarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda FIP ile enfekte kedilerin farklı bir immunosupressif virus ile süper enfeksiyonunda, virusun aktive olduğu ve klinik semptomların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Pedersen ve ark., 2008).

1.4. İmmunoloji

1.4.1. Pasif immunite

Kedilerde maternal antikorlar 5-6 haftalık yaşa kadar FCoV'a karşı immunite sağlamaktadır (Addie ve Jarrett. 1992). Maternal antikor seviyeleri 6-8 haftalık yaştan itibaren düşmekte olup, bu dönemden sonra tespit edilemez (Pedersen ve ark., 1981).

1.4.2. Aktif immunite

1.4.2.1. Hücresel immunite

Deneysel olarak coronavirus ile enfekte edilmiş kedilerden hastalık semptomlarını göstermemiş olanlarda semptomatik olanlara nazaran daha yüksek bir hücresel immun yanıt olduğu ortaya konulmuştur (Thiel, 2007) . Sitokinler, viral patogenezde çok farklı görevler üstlenebilirler. Örneğin interferon gama (IF-γ) ve Tümör Nekrotizan Faktör alfa (TNF-α) sitotoksik T hücrelerini uyararak MHC ekspresyonunu arttırır (Roitt ve ark., 1993).

FIP enfeksiyonunda interleukin-12 (IL-12) ve IF-γ düzeyleri düşer (Kiss ve ark., 2004). Hem kan dolaşımındaki hem de lenfoid dokulardaki T lenfositler ve lenfoid dokulardaki B lenfositlerin sayılarında önemli bir azalma şekillenir (Kipar ve ark., 2001). Her ne kadar FIPV'unun T ve B lenfositler üzerine direkt bir etkisi bulunmasa da, indirekt etkilenmeyle bu hücrelerin apoptosisi sonucu sayılarındaki değişim açıklanabilmektedir. Artan makrofajlarda bulunan virus, kan dolaşımıyla vücuda yayılmaktadır. Enfekte monosit ve

makrofajlar küçük çaplı damarların endoteline yapışarak bu bölgelerde yığınlara, yangıya ve koagulasyona sebep olurlar.

1.4.2.2. Humoral immunite

FECV'un fekal–oral yolla alımı sonrası, permisif intestinal hücreye girişinin ardından, interferon ve interleukinler gibi kemotaktik faktörler ortama salınarak yangı hücreleri bölgeye toplanır. Kedinin immun durumu enfeksiyonu kontrol altına almakta en önemli faktördür. Enfeksiyon immun yanıtı yüksek olmayan kedilerde hafif ishal meydana getirirken, immun yanıtın kuvvetli olduğu durumlarda subklinik seyreder. Ayrıca B lenfositler tarafından salınan IgG ve IgA'lar kediyi Enterik Coronavirus enfeksiyonuna bağışık kılarken, reenfeksiyon durumlarında hastalığın subklinik seyretmesine de olanak sağlarlar.

FECV'a karşı oluşan antikorlar enfeksiyonu takip eden 14-21. günde tespit edilmeye başlar. Virusun sindirim kanalında enfeksiyon meydana getirmesi sebebiyle bu antikorlar çoğunlukla IgA yapısındadırlar ve sistemik antikor titresi genellikle düşük kalır. FECV'a karşı oluşan antikor titrelerinin hastalığın patogenezini belirlediği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Herrewegh ve ark, 1997). Antikorlar organizmada bulunmasına rağmen, persiste enfeksiyona bağlı olarak virusun 300 güne kadar saçılmaya devam ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Herrewegh ve ark, 1997). Spike proteinine karşı oluşan antikorların, nötralizasyondaki görevi tam olarak anlaşılamamıştır.

FECV'a karşı oluşan antikorlar FIP için koruyucu değildir. Hatta bu oluşan antikorlar ölümcül bile olabilmektedir. FCoV antikorlarına sahip kedilerde FIP enfeksiyonu daha ağır olarak seyretmektedir. Deneysel olarak yapılan bir çalışmada; rekombinant aşı suşu ile aşılanan kedilere challenge olarak

verilen mutant FIP virusu bu kedilerde 7 günlük inkubasyon sonunda ciddi klinik bulgulara neden olurken, aşılanmayan gruptaki kedilerde challenge virus 28 gün sonra bile ciddi bir klinik tablo oluşturamamıştır (Vennema, 1990). FCoV ile ilgili ilerleyen çalışmalarda oluşan bu tablonun immun kompleks bağımlı sitotoksik reaksiyon (Tip 3) olduğu bildirilmiştir.

Tip 3 aşırı duyarlılık reaksiyonu 'Klasik Arthus Tip' cevap olarak da adlandırılır. Tüm viral enfeksiyonlarda gözlenen kan dolaşımındaki antijen-antikor komplekslerinin akibeti, antikorların antijenlere oranına bağlıdır. Eğer antikorlar virionun tüm antijenik determinantlarını kapatacak kadar fazlaysa, antijen-antikor kompleksleri makrofajlar tarafından yok edilirler. Eğer antikor ve antijen sayıları eşitse, önce örümcek ağı benzeri yapılar oluşturulup sonrasında daha büyük yığınlara dönüşerek retiküloendotelyal sistem tarafından yok edilirler. Ancak bazı persiste enfeksiyonlarda, virionlar kan dolaşımına katılmaya devam ettikleri sürece ya özellikle nötralizan antikor yanıtının yetersiz kalmasından ya da antikor aviditesinin düşük olmasından dolayı antijen-antikor kompleksleri haftalar, hatta aylar boyunca glomerüllerde birikmektedir. Bu birikim zamanla glomerüler infiltrasyona ve kronik böbrek yetmezliğine yol açar. Dolaşımdaki immun kompleksler sadece böbreklerde değil, birçok organ ve dokuda birikerek makrofajların bu bölgelerde yoğunlaşmasını ve komplementin aktive olmasını sağlarlar. Komplementin varlığı ile kemotaksis başlatılır ve nötrofillerin bölgeye gelmesi sağlanır. Oluşan antikorların bir görevi de opsonizasyondur, yani virusların makrofajlara alınımı ve yıkımlanmasını sağlarlar. Makrofajlar antijen-antikor kompleksleriyle karşılaştıklarında TNF-α, IL-1, Platelet aktive edici faktör, nitrik oksit ve oksijen radikallerini salgılamaya başlarlar. IL-1 ve TNF-α damar endotelinin permeabilitesini bozarak nötrofil lökositler ve fibrinin bölgeye göç etmesine neden olur. Fibrin böbrekler, akciğer, böbrek üstü bezi gibi birçok dokuda birikmeye başlayarak koagulasyona (DIC) neden olur. Nötrofiler degranülasyon, serbest radikaller, proteazlar ve nitrik oksit doku hasarına ve vaskülitise sebep olarak FIP'teki makroskobik bulguların oluşmasını

sağlarlar. Bu reaksiyonlar sonucu gelişen asites tipik bulgudur. Sistemik immun kompleks reaksiyonları pıhtılaşma olayındaki enzimleri aktive ederek histamin salgılanmasına ve vasküler permeabilite artışına sebep olurlar. Antijen-Antikor bağımlı kompleksler sonucunda meydana gelen sitotoksik etki ölümle sonuçlanmaktadır.

1.5. FCoV Enfeksiyonlarının Tanısı

FCoV tanısı için 1960'lardan günümüze birçok test geliştirilmiştir. FIP hastalığının teşhisi için hiç bir yöntem tek başına yeterli olmadığından, tüm testler ve klinik semptomlar birlikte değerlendirilmelidir. Bu sebeple hastalığın patogenezinin anlaşılmasında laboratuvar bulgularının yanısıra klinik bulgularının da değerlendirilmesi önemlidir.

1.5.1 Nekropsi

Nekropsi, özellikle FIP enfeksiyonu tanısı için 'gold standart' kabul edilmektedir. Diğer tüm testlerde olduğu gibi klinik bulgularla eşleştirilerek kullanılmalıdır. Peritoneal ve pleural boşluklardaki organlarda serozadan paranşime doğru ilerleyen yangısal lezyonlar, pyogranulomatöz değişiklikler, effüzyon ve fibrin birikimi FIP'i çağrıştırmaktadır.

1.5.2. Viral Tanı

Kronik FECV enfeksiyonlarında virus intestinal kanalın yanısıra diğer organ ve dokularda da immunohistokimyasal ve hatta moleküler yöntemlerle tespit edilebilmektedir (Herrewegh ve ark., 1997; Meli ve ark., 2004). Ancak replikasyonu gösteren mRNA'lar sadece virusun persiste kaldığı yerde bulunmaktadır. Aynen FIPV gibi FECV da kanda monosit ve makrofajlarda bulunabilmektedir.

1.5.2.1 Virus İzolasyonu

Virus izolasyonu amacıyla kedi kökenli hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu amaçla Felis catus whole fetus-4 (Fcwf-4), Crandell Feline Kidney (CrFK) gibi hücre hatları kullanıldığı gibi, FCOV ile enfekte hayvanların makrofaj hücre kültürlerinde de virus izolasyonu yapılmaktadır. FCOV serotipleri arasında *in vitro* üreme kabiliyetleri gibi, enterik ve mutant tipteki virusların üretilme kabiliyetleri de farklılık gösterir. Özellikle saha suşlarının üretilmesinde bazı güçlükler ile karşılaşıldığı bildirilmiş olup enterik kökenli olan suşların hücre kültürlerinde üretilemediği, mutant tipteki saha suşlarının ise zorlukla ürediği ifade edilmiştir (Pedersen, 2009). Hem zaman gerektirmesi, hem de yaşanan güçlükler nedeniyle tanı amaçlı virus izolasyonu tercih edilmemektedir.

1.5.2.2 İmmunohistokimyasal Yöntemler

Direkt tanı amacıyla özellikle effüzyon sıvılarından yapılan yayma preparatlarda direkt immunfloresans ve doku örneklerinde immun peroksidaz testleri tercih edilmektedir. Bu teknikler serotipler arasındaki antijenik yakınlık

nedeniyle oluşan çapraz nötralizasyona bağlı olarak, serotiplerin ayrımında sorunlu olmakla birlikte, bu sorun amaca yönelik antikor/konjugatlarınn kullanımıyla giderilebilmektedir. Ancak bu yöntemler biyotiplerin birbirinden ayrımına olanak vermez (Hartmann, 2005).

1.5.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Dizin Analizi

Teknolojinin gelişmesiyle çok çeşitli PCR teknikleri FCoV tanısında kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler olarak FECV ve FIPV birbirinden henüz ayrılamasa da bu mutasyonları bulmayı hedefleyen pek çok sayıda PCR, araştırıcılar tarafından ortaya konulmaya devam etmektedir. Bu amaçla; korunaklı ve korunaklı olmayan bölgelere spesifik primerlerin kullanıldığı çok sayıda PCR türü bulunmaktadır. En çok kullanılan nested PCR olup, sensitivitesi ve spesifitesi diğerlerine göre daha yüksek olduğu için yaygın kullanım alanı bulmuştur. 3’ UTR bölgesi (Herrewegh ve ark, 1995), ORF1ab, 3abc, 7b (Brown ve ark., 2009), M (Brown ve ark., 2009) ve S (Simons ve ark., 2005) bölgelerine yönelik PCR’lar geliştirilmiş olup, hepsinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur.

FECV ve FIPV’larının her ikisinin de kan hücrelerinde tespit edilebilmesi sebebiyle araştırıcılar sayısal, matematiksel, orantısal, kantitatif bir replikasyonun üzerinde durmaya başlamışlardır. 7b (Gut ve ark., 1999), M (Hornyak ve ark., 2012), N (Dye ve ark., 2008) genleri kullanılarak real-time PCR teknikleri geliştirilmiştir.

Ayrıca günümüzde virusun arzu edilen gen bölgelerininin sekans analizlerinin yapılabilirliği, filogenetik analiz imkanını sunmaktadır. Bunun sonucunda FCoV’larda serotip ayrımı yapılabilmekte, diğer hayvan türlerini etkileyen

coronaviruslar ile evrimsel benzerlik ve farklılıkları moleküler düzeyde ortaya konabilmektedir.

1.5.3 Serolojik Tanı

1.5.3.1 ELISA

FCoV'ların serolojik tanısında kullanılmakta olan birçok ELISA tekniği bulunmaktadır. Bunlardan bazıları 7b geni proteinini hedeflerken, bazıları viral glikoproteinleri hedeflemektedir. 7b'nin önceleri sadece FEC virusunda bulunduğu düşünülmüş (Vennema ve ark., 1998) ancak ilerleyen teknikler ile tüm virus suşlarında varlığı tespit edilmiştir. Son yıllarda geliştirilen yeni ELISA kitleri tüm viral glikoproteinleri hedefler şekilde dizayn edilmiş olmakla birlikte, her iki biyotipi birbirinden ayırmada yetersiz kalmaktadırlar. Araştırıcılar bu noktada antikor varlığından ziyade, antikor titrelerini önemsemişlerdir. Düşük titrede antikora sahip kedilerde Enterik Coronavirus ile enfeksiyon olasılığından bahsedilmekteyken, daha yüksek titredeki antikor varlığında asemptomatik/semtomatik FIP enfeksiyonundan söz etmek mümkün olabilmektedir (Pedersen, 2009).

Serolojik yöntemler olarak virus nötralizasyon testi, İmmun Floresans Testi (IFA) ve ELISA'nın diagnostik anlamda karşılaştırmasını yapan araştırıcılar; ELISA'nın FCoV'larının hepsini, serotip ayrımı (serotip 1 ve 2) yapmaksızın pozitif bulması sebebiyle hassasiyetinin daha yüksek olduğunu savunmuşlardır (Pratelli, 2008).

1.5.3.2. Virus Nötralizasyon Testi

FCoV enfeksiyonunun serolojik tanısında kullanılan virus nötralizasyon testi ‘’gold standart’’ olup, bu testlerle hem enfeksiyon varlığının belirlenmesi ve hem de serotip ayrımı yapılmaktadır. Ancak her iki serotipte de hem FECV hem de FIP virusu ile enfeksiyon mümkün olduğundan, bu test ile de biyotip tayini yapılamamaktadır (Shiba ve ark., 2007). Özellikle S proteininin nötralizan antikor yapımını uyarması sebebiyle test edilen antikorların çoğu S glikoproteini epitoplarına özgüdür. Ayrıca hücre kültürüne adapte virus üretimi gerektirdiğinden virus nötralizasyon testlerinin uygulanabilmesi için uygun ve deneyimli bir laboratuvar ortamı gereksinimi bulunmaktadır.

1.5.4. Hematolojik Bulgular

FCoV enfeksiyonlarında hematolojik ve klinik biyokimya bulguları oldukça değişkendir. Kandaki ilk bulgular lökositoz şeklindedir; sonraları nötrofil sayısında düşüş görülür. Orta düzeyde lökopeni de gözlemlenebilmektedir. Kan serumunda özellikle alanine transaminase (ALT), glutamat-dehydrogenase (GLDH), sıklıkla aspartate transaminase (AST), alkalen phosphatase (ALP) ve bilirubin değerleri yükselir (McReynolds ve Macy, 1997). Böbrek bozukluklarında üre ve kreatinin kan plazma konsantrasyonları oldukça yüksektir.

Albumin/globulin (A/G) oranlarının cut-off değerinin ≥ 0.8 olması, yaş form FIP için karakteristik bulgudur. Effüzyon sıvısındaki A/G ≤ 0.4 ise FIP olma ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Shelly ve ark. 1988).

Bu çalışmada; FCoV enfeksiyonlarının hem serolojik hem de 3’ UTR ve M gen bölgesi hedef alınarak uygulanan RT-PCR ve dizin analizi kullanılarak moleküler temelli araştırılması ve bu sayede tüm dünyada evcil ve yaban hayattaki kedigillerde yaygın olarak görülen hastalığın; Türkiye’deki sağlıklı görünümlü, ishal semptomlu ve klinik olarak FIP tanısı konulmuş evcil kedi populasyonlarındaki epidemiyolojik durumunun aydınlatılması konu edinilmiştir. Ayrıca saptanan bazı FCoV’ların dizin analizlerinin yapılması ile moleküler karakterizasyonlarına ait bulguların da elde edilmesi hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereç

2.1.1. Örneklenen Hayvanlar

Bu çalışmada, 2010-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri ve özel veteriner kliniklerine getirilen klinik olarak sağlıklı görünümlü (asemptomatik) ve/veya klinik bulgulu (diyare, asites, *Horner Sendromu*, merkezi sinir sistemi bulguları, büyüme geriliği, kilo kaybı, gingivitis, korneada ulcus, körlük, otitis, dermatitis, lenfadenopati, poliüri, dizüri, polidipsi, halsizlik, dehidrasyon, iştahsızlık, üst solunum yolu enfeksiyonu sonucu konjuktival ve nasal akıntı, pleuritis vb.) ve/veya hemogram ve biyokimyasal değişiklikleri (lenfopeni, nötrofili, lökopeni, hepatitis, ikterus) bilinen 152 kediden alınan kan ve rektal sürüntü örnekleri (Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Kararı No: 2011-105-385 (Ek 1)) kullanıldı. Örneklenen kedilerin sahipleri tarafından doldurulan anket formlarına göre edinilen yaş, ırk, cinsiyet, sağlık durumu, çoklu veya tekli barınma, aşı durumu (FCoV harici enfeksiyonlara karşı) bireysel bilgileri Ek 2.'de, söz konusu bilgilerle hazırlanan genel tablolar Çizelge 2.1. ve Resim 2.1-7.'de sunulmuştur. Türkiye'de FCoV'a karşı ruhsatlandırılmış ticari aşı bulunmamakdır. Söz konusu kedilere uygulanan aşılar Feline Herpesvirus, Feline Calicivirus, Feline Leukemia Virus, Feline Panleukopenia Virus ve Rabies Virus enfeksiyonlarına yöneliktir.

Çizelge 2.1. Örneklenen kedilere (n=152) ilişkin bilgiler

Anket Verileri			Sayı
Cinsiyet	Dişi		74
	Erkek		78
Yaş	0-12 ay yaş		82
	13-24 ay yaş		29
	2 yaş ve üstü		41
Yaşam koşulları	Sokak		46
	Ev		39
	Ev-Adopted		66
Barınma koşulları	Tekli		63
	Çoklu		87
	Bilinmeyen		2
Aşı durumu	Aşılı		83
	Aşısız		68
Klinik bulgular	Asemptomatik		70
	Klinik Bulgulu	Hemogram Ve Biyokimyasal	6
		Asites	16
		İshal	28
		Diğer	35

Örneklenen kedilerde gözlenen FCoV enfeksiyonuna spesifik bazı klinik bulgular aşağıdaki resimlerde sunulmuştur.

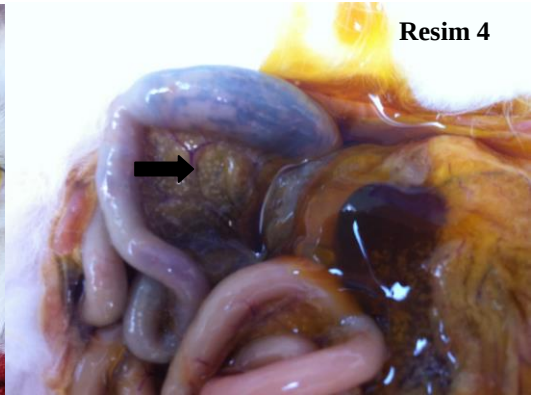




Resim 2.1. Şiddetli pleuritisi bulunan bir kediden alınan effüzyon sıvısı (FIP pozitif)

Resim 2.2. Kuru form FIP'te görülen Horner sendromu

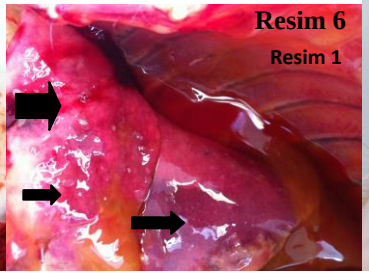


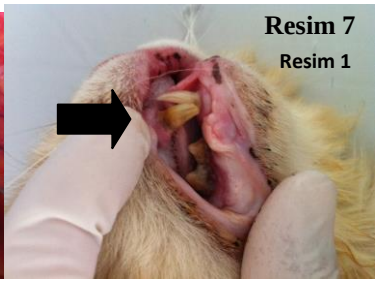


Resim 2.3. Yaş form FIP'te görülen effüzyon ve fibrin birikimleri

Resim 2.4. Antijen antikor kompleksine bağlı granülomatoz birikimler







Resim 2.5. Böbrekte kanama

Resim 2.6. Dalakta kanama odakları ve granülomatoz lezyonlar

Resim 2.7. Gingivitis

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

2.1.2.1. Antikor ELISA Kiti

FCoV'a spesifik antikorların tespiti amacıyla ticari olarak temin edilen ELISA kitleri (EVL Laboratories, Hollanda, Cat No: F1005-AB02) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

2.2.1.1.1. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması

EDTA içeren antikoagulanlı tüplere (Vacutainer, Almanya) alınan kan örnekleri +4°C'de, 1500 rpm'de, 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Lökosit tabakası nükleik asit varlığını araştırmak üzere 350 µl alınarak RNAase ve DNAase yoksun bir tüpe aktarıldı. Geri kalan miktar ise şahit numune olarak -80°C 'de saklandı.

2.2.1.1.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması

Laboratuvara serum örneği gönderilmeyen hayvanların plazma örnekleri serolojik testlerde kullanılmak amacıyla stoklandı. Bu amaçla EDTA içeren tüplere (Vacutainer, Almanya) alınan kan örnekleri +4°C'de 1500 rpm'de 10

dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj ile ayrılan kan plazmasından 100 µl steril tüplere aktarılarak test aşamasına kadar -80°C ‘de saklandı.

2.2.1.1.3. Serum Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu tüplere (Greiner, Almanya) alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı takiben +4°C’de 3000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj ile ayrılan kan serumu steril tüplere ayrılarak test aşamasına kadar -80°C ‘de saklandı.

2.2.1.2. Rektal Sürüntü Örneklerinin Hazırlanması

Rektal sürüntü örnekleri, içerisinde 2 ml 25000 U/ml Penisillin ve 20 mg/ml streptomisin içeren Fosfat Tampon Tuz Solusyonu (PBS) bulunan, selüloz fiber kaplı ticari sürüntü çubukları (Cultiplast-LP, İtalya) kullanılarak toplandı. Laboratuvarda sürüntü tüpleri vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra tampon sıvı 1,5 ml’lik Dnase Rnase ari tüplere alındı. +4°C ‘de 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan nükleik asit varlığını araştırmak amacıyla 350 µl alınarak 1.5 ml’lik tüplere aktarıldı, geri kalan miktar şahit numune olarak -80°C ‘de saklandı.

2.2.2. Moleküler Teşhis Ve Karakterizasyon

Araştırma materyalini oluşturan toplam 152 hayvandan sağlanan kan ve rektal sürüntü örneklerinin tümü GAPDH (Gliseraldehit 3- fosfat dehidrogenaz), M ve 3’ UTR yönünden PCR’a tabi tutuldu. Bu amaçla, Herrewegh ve ark. (1995) 3’ UTR bölgesine ve Simons ve ark. (2005) M geni bölgesine yönelik kullandıkları primerler özel bir firmaya (IDT, ABD) sentezlettirilerek kullanıldı.

2.2.2.1. Viral Nükleik Asidin Hazırlanması ve RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu amacıyla ticari bir kit (High Pure Viral RNA Ekstraksiyon Kiti, Roche, Almanya) üretici firmanın önerdiği protokole göre kullanıldı.

2.2.2.2. Viral RNA'nın Reverz Transkripsiyonu (RT)

Elde edilen RNA, komplementer DNA (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla Reverse Transkriptase enzimi içeren ticari bir kit (First Strand cDNA sentez kiti, Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Yapılan karışımların içerikleri ve uygulanan ısı döngüleri Çizelge 2.2 ve 2.3.'de verildi. Tüm bu işlemler için termal çevirici cihaz (Biometra, Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.2. RT-PCR Karışımları ve Bileşenleri

KARIŞIM 1		**KARIŞIM 2**	
Bileşenler	**Miktar (µl)**	**Bileşenler**	**Miktar (µl)**
RNA Ekstraktı	3	5X RT Tampon 2	2
Hegzamer Primerler	0.5	dNTP (10 mM)	1
Deiyonize Su (18 MOhm/cm)	3	MMLV Reverz	0.5
Toplam Hacim	6.5	Toplam Hacim	3.5

Çizelge 2.3. cDNA sentezi için uygulanan ısı döngüleri

Uygulanan ısı	Süresi
70°C	5 dakika
25°C	10 dakika
37°C	60 dakika
70°C	5 dakika

2.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Reverse transkripsiyonu takiben örneklerin tümü; kedi GAPDH geni (internal kontrol), FCoV M geni ve 3' UTR gen bölgesi spesifik primerler (Çizelge 2.4) kullanılarak PCR işlemine tabii tutuldu.

Çizelge 2.4. PCR'da Kullanılan Primer Dizinleri ve Elde Edilen Ürün Büyüklükleri

Primer Adı	Dizin	Ürün Büyüklüğü
FCoV 3' UTR 1. Tur F (P205)	GGCAACCCGATGTTTAAAACTGG	223 bp
FCoV 3' UTR 1. Tur R (P211)	CACTAGATCCAGACGTTAGCTC	
FCoV 3' UTR 2. Tur F (P276)	CCGAGGAATTACTGGTCATCGCG	177 bp
FCoV 3' UTR 2. Tur R (P204)	GCTCTTCCATTGTTGGCTCGTC	
FIP M Geni F	GTGCTAGATTTGTCTTCGGACACC	295 bp
FIP M Geni R	TAATGCCATACACGAACCAGCT	
Feline GAPDH Geni F	CCATGGAGAAGGCTGGGG	195 bp
Feline GAPDH Geni R	CAAAGTTGTCATGGATGACC	

F: Forward

R: Reverse

Her bir örneğe DNA amplifikasyonu amacıyla M geni ve GAPDH geni spesifik primerler ile konvansiyonel PCR uygulanırken; 3'UTR geni spesifik primerler ile nested PCR reaksiyonu uygulandı. PCR karışımlarının bileşimi ve ısı döngüleri sırasıyla Çizelge 2.5. ve 2.6.'de sunulmuştur.

GAPDH geni primerleri, FCoV M geni primerleri ve 3' UTR gen bölgesi dış primerleriyle hazırlanan 30 µl.lik karışımlar, 94°C'de 5 dakikalık denatürasyon basamağından sonra, 56°C'de 45 sn, 72°C'de 45 sn, 94°C'de 45 snlik 35 döngüden sonra 56°C'de 1 dakika, 72°C'de 10 dakika son uzama basamağından oluşan ısı döngülerine maruz bırakıldı. FCoV 3' UTR gen bölgesi iç primerleriyle hazırlanan PCR karışımı ise 94°C'de 5 dakikalık denatürasyon basamağından sonra, 62°C'de 45 sn, 72°C'de 45 sn, 94°C'de 45 snlik 35 döngüden sonra 62°C'de 1 dakika, 72°C'de 10 dakika son uzama basamağından oluşan ısı döngülerine maruz bırakıldı.

Çizelge 2.5. PCR Karışımının Bileşimi

PCR Karışımı		
Bileşen	Miktar (µl)	Konsantrasyon
cDNA	3	
Taq DNA Polimeraz	0.25	3U
10X Tampon	3	1X
MgCl2 (25mM)	2.4	2.0 mM
dNTP (10mM)	0.5	0.04µM
Primer F (10pmol)	0.5	0.32µM
Primer R (10 pmol)	0.5	0.32µM
Deiyonize Su (18MOhm/cm)	19.85	
Toplam Reaksiyon Hacmi	30 µl	

Çizelge 2.6. PCR Karışımına Uygulanan Isı Döngüleri

	FCOV TESPİTİ			İNTERNAL KONTROL
Basamağın Adı	3' UTR 1. Tur	3' UTR 2. Tur	M geni	Feline GAPDH geni
Birincil denatürasyon	95° C 5 dk	95° C 5 dk	95° C 5 dk	95° C 5 dk
Yapışma	55° C 45 sn	62° C 45 sn	55° C 45 sn	55° C 45 sn
Uzama	72° C 45 sn	72° C 45 sn	72° C 45 sn	72° C 45 sn
Denatürasyon	95° C 30 sn	95° C 30 sn	95° C 30 sn	95° C 30 sn
Final uzaması	72° C 10 dk	72° C 10 dk	72° C 10 dk	72° C 10 dk

2.2.2.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Görüntülenmesi

Elde edilen amplikonlar 0.5 µg/ml etidyum bromid (Sigma, ABD) içeren %1'lik Agaroz (Prone, EU) jelde, 0.5 X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) tamponu içerisinde 8 volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dakika süre ile elektroforeze tabii tutuldu. PCR ürünleri, 6X yükleme boyası (10 mM Tris-HCl, %0.03 bromophenol blue, %60 gliserol, 60 mM EDTA) kullanılarak jele yerleştirildi. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için PCR ürünleri ile birlikte 1 µl 100 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) jele yüklendi. Jelin görüntülenmesi amacıyla UV transilluminator (Vilber Lourmat, Fransa) ve jel dökümantasyon sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanıldı.

2.2.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

FCoV 3' UTR gen bölgesi hedef alınarak uygulanan PCR sonucunda amplifiye olmuş DNA'yı içeren PCR karışımları bir ticari kit (High Pure PCR clean/extraction kit, Roche, Almanya) yardımıyla üretici firma tarafından bildirilen prosedüre göre temizleme ve saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Elde edilen DNA, dizin analizinde kullanıldı.

2.2.2.6. Dizin Analizi

Dizin analizi Beckman Coulter (ABD) CEQ 8000 Genetik Analiz Sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Saf olarak elde edilmiş DNA örnekleri, aynı firmanın Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) kiti kullanılarak (Çizelge 2.8) termal çeviricide (Biometra, ABD), 96°C de 20 sn, 50°C de 20 sn ve 60°C de 4 dakikalık 30 döngüden oluşan dizin reaksiyonuna sokuldu. Dizinleme reaksiyon kit ve reaksiyon karışımları Çizelge 2.7 ve 2.8.'da sunulmuştur. Reaksiyon ürünleri CEQ 8000 Genetik Analiz Sistem cihazında kapiller elektroforez yöntemi ile analiz edildi. Elde edilen dizinlerin ham analizi üretici firma (Beckman- Coulter) tarafından sağlanan yazılım ile gerçekleştirildi.

Çizelge 2.7. Dye Termination Cycle Sequencing (DTCS) kit karışımı.

DTCS Kit Karışımı	
Bileşen	Miktar (µl)
10X Reaksiyon Tamponu	2
dNTP Karışımı	1
DdUTP	2
DdGTP	1
DdCTP	2
DdATP	2
DNA Polimeraz Enzimi	1
TOPLAM HACİM	11

Çizelge 2.8. DNA dizinleme reaksiyon karışımı.

DNA Dizinleme Reaksiyon Karışımı	
Bileşen	Miktar (µl)
DNA Kalıbı	1-7
Primer (10pmol)	2
DTCS Karışımı	11
Deiyonize Su	Toplam hacmi 20 µl'ye
Toplam Reaksiyon Hacmi 20µl	

2.2.2.7. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Dizinler, http://ncbi.nlm.nih.gov adresinden sağlanan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programında Gen Bankasındaki aynı türden veriler ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonrası Gen Bankasından sağlanan dizinler de kullanılarak BioEdit (version 7.0.5.3) programında tüm dizinler ilgili gen bölgeleri yönünden çoklu hizalamaya tabii tutuldu. Elde edilen nükleotit

dizinlerinin kodladığı amino asit dizinleri Bioedit programı kullanılarak oluşturuldu.

2.2.2.8. Filogenetik Değerlendirme

Ülkemizden elde edilen FCoV suşları ve dünyada bulunan diğer FCoV suşlarının arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla, bu çalışmada elde edilen FcoV saha viruslarının 3' UTR gen bölgesine ilgili dizin analizi nükleotit ve amino asit dizinleri kullanılarak genetik analizler gerçekleştirildi. Dizin analizi ürün kalitesi kriter alınarak seçilen 12 kediye ait kan ve rektal sürüntü örneği, 20 kediye ait kan veya rektal sürüntü örneği olmak üzere toplam 32 hayvana ait 44 örnek üzerinden gerçekleştirildi. Filogenetik analizler internet kullanım izni olan MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 5.0) (Tamura ve ark., 2007) yazılımı yardımıyla elde edildi. Bu amaçla gerek bu araştırmadan elde edilen ve gerekse Gen bankasından indirilen FCoV 3'UTR dizinleri çoklu karşılaştırma işlemi ile hizalanarak Neighbour Joining analizine tabi tutuldu. Bu işlem gerçekleştirilirken 1000 replikasyon ve 111 tesadüfi eşleme ile bootstraping yapılarak analiz duyarlılaştırıldı. Bootstraping değerleri filogenetik ağaç üzerinde gösterildi.

2.2.3. Serolojik Teşhis

2.2.3.1. ELISA

Derin dondurucuda saklanan serum/plazma örnekleri, oda ısısında çözüldü. Her bir göze bir adet numune konulmak kaydıyla test protokolüne göre 1:30 oranında ayrı bir tablette sulandırılan örnekler, test kitinde bulunan ve yine 1:30 oranında sulandırılan pozitif ve negatif kontroller ile birlikte 100'er µl'lik hacimde ELISA tableti gözlerine aktarıldı. Tabletler 60 dakika süre ile bantla kapatılarak inkübe edildi, süre sonunda yıkama solusyonu ile 4 kez yıkandı. Tüm gözlere 100'er µl anti-feline antikorları içeren konjugat eklendikten sonra tabletler 60 dakika süre ile 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gözler 4 kez yıkandı. Test prosedürüne göre hazırlanan substrat solusyonundan 100'er µl gözlere konulup, tabletler 10-15 dakika oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda 50 µl durdurma solusyonu her bir göze eklenerek 450 nm'lik dalga boyundaki mercek kullanılarak ELISA okuyucuda okutuldu. Sonuçlar üretici firma tarafından bildirilen prosedüre göre yorumlanarak 0.350 OD değerinden yukarı olan örnekler antikor varlığı açısından pozitif kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Virolojik bulgular

3.1.1 RT-PCR Bulguları

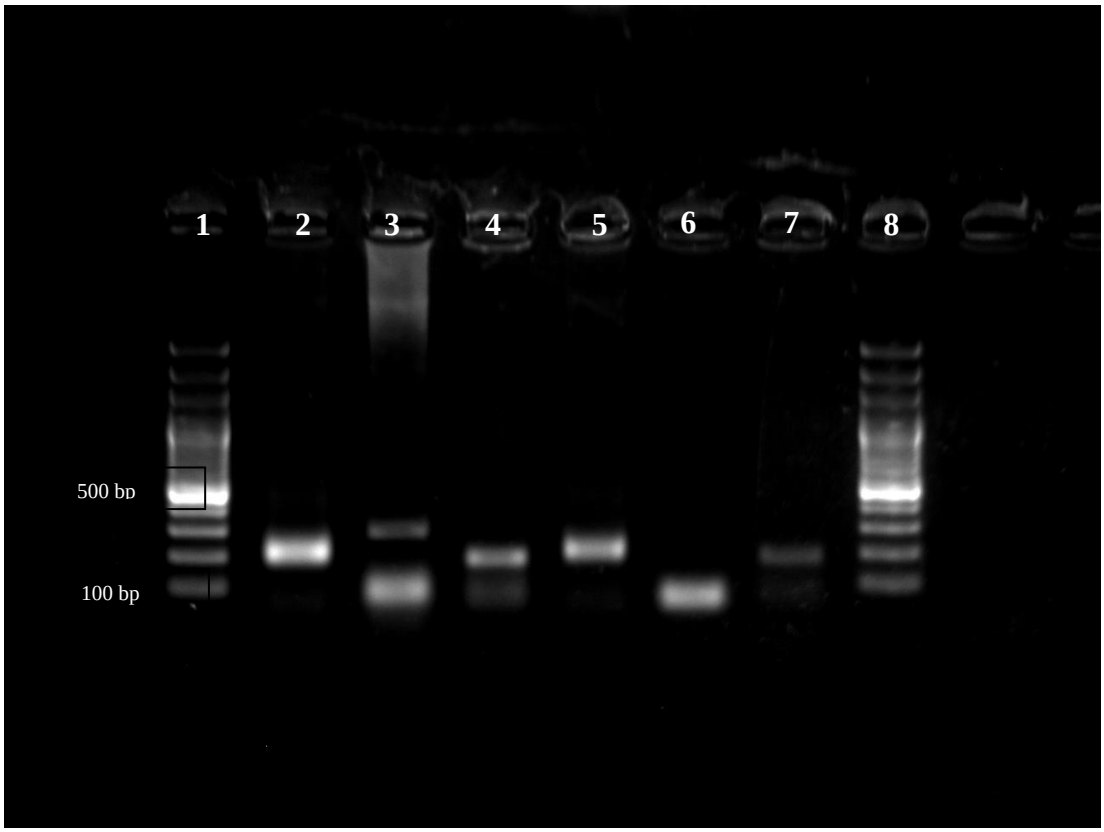
Örneklenen hayvanların kan ve rektal swap örneklerine FCoV 3'UTR (p205-p211 1. tur, p276-p204 2. Tur) ve M geni hedef alınarak ve internal kontrol kontrol olarak da GAPDH geni spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCRs sonucunda hedeflenen büyüklükte (Şekil 3.1) ürün oluşumuna göre hazırlanan, kan ve rektal swap örneklerine ilişkin veriler sırasıyla Çizelge 3.1. ve 3.2.'de sunuldu.

Çizelge 3.1. Kan örneklerinin RT-PCR sonuçları

	GAPDH(+)			GAPDH (-)			Test Edilen		
	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM
3' UTR Pozitif	28	51	79	0	9	9	28	60	88
3' UTR Negatif	23	32	55	0	9	9	23	41	64
TOPLAM	51	83	134	0	18	18	51	101	152

Çizelge 3.2. Rektal sürüntü örneklerinin RT-PCR sonuçları

	GAPDH(+)			GAPDH (-)			Test Edilen		
	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM	M geni Pozitif	M geni Negatif	TOPLAM
3' UTR Pozitif	10	20	30	1	64	65	11	84	95
3' UTR Negatif	7	13	20	1	36	37	8	49	57
TOPLAM	17	33	50	2	100	102	19	133	152



Şekil 3.1. Hedeflenen bölgeye göre yapılan PCR görüntüleri ve pozitif ürünler

1: Merdiven (100 bp'lik), 2: GAPDH pozitif örnek, 3: M geni pozitif örnek, 4: 3' UTR pozitif örnek, 5: GAPDH pozitif örnek, 6: M geni negatif örnek, 7: 3' UTR pozitif örnek, 8: Merdiven (100 bp'lik)

Araştırma kapsamında değerlendirilen toplam 152 kedinin GAPDH PCR sonuçları göz ardı edilerek kan ve rektal sürüntü örneklerine ilişkin verileri,

enfeksiyonunun patogenezine ilişkin olarak yapılacak değerlendirmelere kolaylık sağlamak amacıyla Çizelge 3.3.'de sunuldu.

Çizelge 3.3. Örneklenen kedilerin (n=152) kan ve rektal sürüntülerine uygulanan PCR sonuçları

			Rektal Sürüntü				
			M geni Pozitif		M geni Negatif		
			3' UTR Poz	3' UTR Neg	3' UTR Poz	3' UTR Neg	Toplam
Kan	M geni Pozitif	3' UTR poz	5	5	15	3	28
		3'UTR neg	1	2	8	12	23
	M geni Negatif	3' UTR poz	1	1	44	14	60
		3'UTR neg	4	YOK	17	20	41
Toplam			11	8	84	49	152

Çizelge 3.1'de bildirildiği üzere, test edilen 152 kedinin kanlarının 134'ü (%88.2) GAPDH primerleri ile, 51/152 (%33.5) M geni ile 88/152 (%57.8) ise 3' UTR primerleri ile pozitif bulundu. Elde edilen bireysel veriler değerlendirildiğinde, internal kontrol olarak kullanılan GAPDH geni yönünden negatif olan 18 (%11.8) adet kediden 9 'unun (%50) 3'UTR primerleri ile pozitif olduğu görüldü. Bu olguların bir kısmının (n= 3) dizin analizi sonuçları elde edildiğinden (Çizelge 3.6) bu durumun teknik hata, vb. nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmekle beraber, epidemiyolojik değerlendirmelerin güvenilirliğini arttırmak adına istatistik analizlerin bu örnekler hariç tutularak, toplam 134 kedi üzerinden gerçekleştirilmesi uygun görüldü.

Çizelge 3.2'de bildirildiği üzere, test edilen 152 kedinin rektal sürüntü örneklerinin 50'si (%32.8) GAPDH primerleri ile, 19'u ise (%12.5) M geni ile ve 95'i (%62.5) 3' UTR primerleri ile pozitif bulundu. Rektal sürüntü örneklerinde de internal kontrol olarak kullanılan GAPDH geni negatif

olmasına rağmen M geni pozitif sonuç veren iki örnekten her ikisinin de kan örneklerinde GAPDH, M ve 3'UTR genlerine yönelik yapılan PCR'ların pozitif sonuç verdiği görüldü. Rektal sürüntü örneklerinde internal kontrolün pozitifliğinin az olmasının önemli ölçüde örneklerdeki epitel sayısının azlığından kaynaklandığı düşünüldü. Bu nedenle epidemiyolojik değerlendirmeler yapılırken, toplam 152 kedinin rektal sürüntü örneklerine ait M ve 3' UTR gen bölgesi için uygulanan PCR sonuçları kullanıldı. Sonuç olarak, kan örneklerine uygulanan PCR'da GAPDH geni negatif bulunan kediler ve rektal sürüntü örneklerine ilişkin GAPDH geni negatifliği göz ardı edilerek hazırlanan, toplam 152 kediye ait kan ve rektal sürüntü örneklerine ilişkin PCR sonuçları Çizelge 3.3. 'de ve kan örneklerine uygulanan PCR'da GAPDH geni negatifliği göz önünde bulundurularak ancak rektal sürüntü örneği GAPDH geni negatifliği göz ardı edilerek hazırlanan, toplam 134 kediye ait kan ve rektal sürüntü örneklerine ilişkin PCR sonuçları Çizelge 3.4.'te sunuldu. Sözkonusu 134 kediye ait yaş,barınma şekli, klinik bulgu, vb. gibi bilgiler ise Çizelge 3.5'de sunuldu.

Çizelge 3.4. Kan GAPDH geni pozitifliği kriter alınan kedilerin (n=134) kan ve rektal sürüntü örneği PCR sonuçları

			Rektal Sürüntü				
			M geni Pozitif		M geni Negatif		
			3' UTR Poz	3' UTR Neg	3' UTR Poz	3' UTR Neg	Toplam
Kan	M geni Pozitif	3' UTR Poz	5	5	15	3	28
		3'UTR Neg	1	2	8	12	23
	M geni Negatif	3' UTR Poz	1	1	37	12	51
		3'UTR Neg	3	YOK	14	15	32
Toplam			10	8	74	42	134

Çizelge 3.5. Kan GAPDH geni pozitifliği kriter alınan kedilere (n=134) ait veriler

Anket Verileri (n=134)			Sayı	FCoV (+)	M geni (+)
Cinsiyet	Dişi		65	56	21
	Erkek		69	63	30
Yaş	0-12 ay yaş		78	68	34
	13-24 ay yaş		26	24	10
	2 yaş ve üstü		30	27	7
Yaşam koşulları	Sokak		42	38	17
	Ev		32	30	13
	Ev-Adopted		60	51	21
Barınma koşulları	Tekli		55	49	25
	Çoklu		78	69	26
	Bilinmeyen		1	1	
Aşı durumu	Aşılı		69	65	31
	Aşısız		65	54	20
Klinik bulgular	Asemptomatik		60	51	16
	Klinik Bulgulu	Hemogram Ve Biyokimyasal	5	4	2
		Asites	16*	16	13
		İshal	26**	22	8
		Diğer	30	28	13

*: Hayvanlardan birinde hem ascites hem hepatitis
**: Hayvanlardan birinde hem ishal hem ÜSYE

Kan GAPDH pozitif 134 hayvandan 15 adedi (15/134, %11,2) hem M geni hem de 3'UTR bölgesi primerleri ile kan ve rektal sürüntü örneklerinde negatif sonuç verdi. Bu kediler, RT-PCR sonuçlarına göre FCoV enfeksiyonu yönünden negatif olarak kabul edildi. Geri kalan 119 hayvanın FCoV ile enfekte olduğu tespit edildi. FCoV enfekte olanların 68 (68/119, %57,1) adedi; kan örneklerinde M geni primerleri ile negatif, kan ve/veya rektal swap örneklerinde ise 3'UTR primerleri ile pozitif bulundu. FCoV enfekte olanların

51 (51/119, %42,8) adedi kan örneklerinde M geni primerleri ile pozitif reaksiyon verirken, bunlardan 29 adedi 3'UTR primerleri ile pozitif, 22 adedi ise negatif olarak tespit edildi (Çizelge 3.4.)

3.1.2. PCR sonuçları ve Bireysel verilerin (yaş, barınma, vb) Değerlendirilmesi

Örneklenen kedilerin anket sorularına alınan cevaplar ışığında yaş, ırk, cinsiyet, bakım koşulları (ev/sokak- tekli/çoklu), aşılı olup olmadıkları, klinik bulgulu olup olmadıklarına dair veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre, tekli veya çoklu bakım koşullarına sahip kedilerde hastalık semptomlarının varlığı/yokluğu yönünden yapılan Ki-kare testi sonucunda, çoklu ortamda yaşayanların daha çok asemptomatik olduğu ve tekli bakım koşullarına sahip olanların ise daha çok asites klinik bulgusunu gösterdikleri ortaya çıktı. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p= 0.046$).

FCoV enfeksiyonunun tanısında klinik bulguların önemi gözardı edilmemekle birlikte, laboratuvar bulguları ışığında enfeksiyonun epidemiyolojisine ilişkin değerlendirmelerin yapılması uygun görüldü. Bu noktada yapılan analizlerde yaş ($p= 0.117$), cinsiyet ($p= 0.345$) ve ırk ($p= 0.730$) özellikleri açısından istatistiksel olarak RT-PCR ile pozitif tespit edilen hayvanları öne çıkaracak herhangi bir anlamlı farklılık bulunamadı.

Hayvanların klinik bulgulu olup olmadıkları ile RT-PCR sonucunda FCoV enfeksiyonu yönünden pozitiflik durumları arasındaki ilişki Ki-kare testi ile sorgulandığında kanda mRNA'sı pozitif olan hayvanların klinik semptomlu oldukları belirlendi ve bu durum anlamlı bulundu ($p= 0.042$). M geni primerleri ile FCoV enfeksiyonu pozitif bulunan kedilerde gözlenen klinik semptomların

çeşitliliğinin sorgulandığı istatistiksel değerlendirmede, diğer klinik semptomlara göre hastalığın karakteristik bulgusu olan asites yoğun bulundu (p= 0.001).

Örneklenen hayvanlardan klinik bulgu göstermeyen 60 hayvanın 35'inin, kan ve/veya rektal sürüntü örnekleri 3'UTR primerleri ile pozitif (35/60, %58,3) olduğu belirlenmiş ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.042). Bu durum asemptomatik kediler arasında FCoV enfeksiyonunun yaygın olabileceği görüşünü doğurdu.

3.1.3. Dizin Analizi ve Filogenetik Değerlendirme

PCR sonucunda 3'UTR bölgesi yönünden kuvvetli pozitiflik tespit edilen 32 kediye ait toplam 44 materyal (12 hayvana ait kan ve rektal sürüntü örneği, 20 hayvana ait kan veya rektal sürüntü örneği) dizin analizine alındı (Çizelge 3.6., Ek-3) Elde edilen dizinlerin filogenetik analizleri, Maksimum-Likelihood (ML) ve Neighbour-Joining (NJ) olmak üzere iki farklı metod kullanılarak gerçekleştirildi. ML metodu ile çizilen ancestral ağaçta (Şekil 3.3.); test edilen örneklerin biri (Kedi adı: Zilli) hariç tümünün FCo viruslar ile aynı dalda yer aldıkları belirlendi.

Kan ve rektal sürüntü örneklerinde 3'UTR bölgesi yönünden kuvvetli pozitiflik veren 12 kediye ait veriler ile hazırlanan filogenetik ağaç (Şekil 3.2.)'de sunuldu. Sözkonusu hayvanların kan ve rektal sürüntü örneklerinden elde edilen ürünlerin nükleotid dizinleri arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla nükleik asit homolojileri karşılaştırıldı (Şekil 3.5). Ayrıca nükleotid dizinlerindeki mutasyonel farklılıkların amino asit değişikliklerine neden olup olmadığı araştırıldı (Şekil 3.3.). Bu analizler

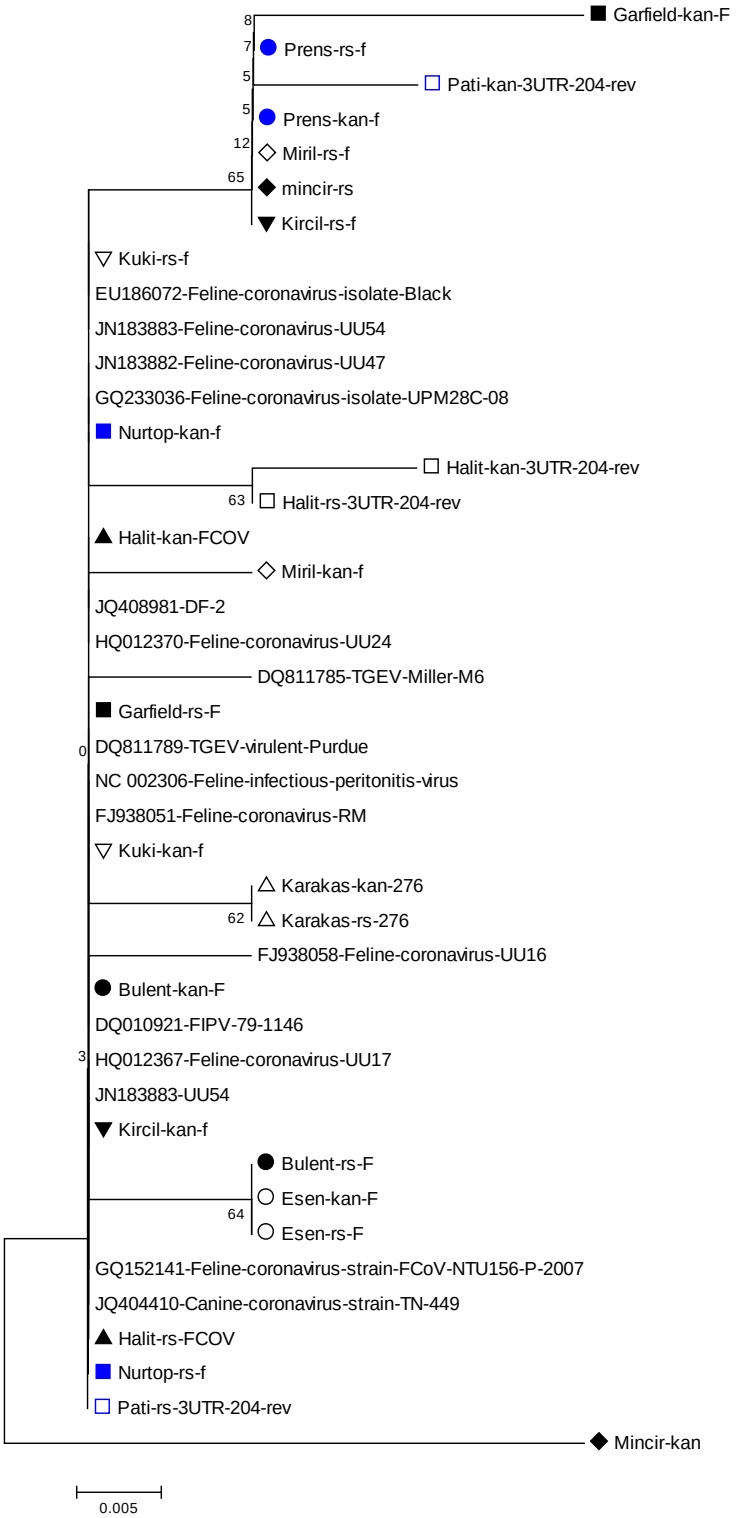
sonucunda 12 çiftli örneğin 9 adedinde mutasyonel farklılıklar olduğu belirlendi. Geri kalan 3 adedinde ise 3'UTR bölgesi sekans analizleri yönünden herhangi farklılık tespit edilemedi ve bu hayvanlarda örnekleme döneminde FCoV'ların hem kanda bulundukları ve hem de gaita yoluyla saçılmakta oldukları kanaatine varıldı.

Çizelge 3.6. FCoV 3'UTR bölgesi dizin analizi yapılan hayvanların PCR ve ELISA sonuçları

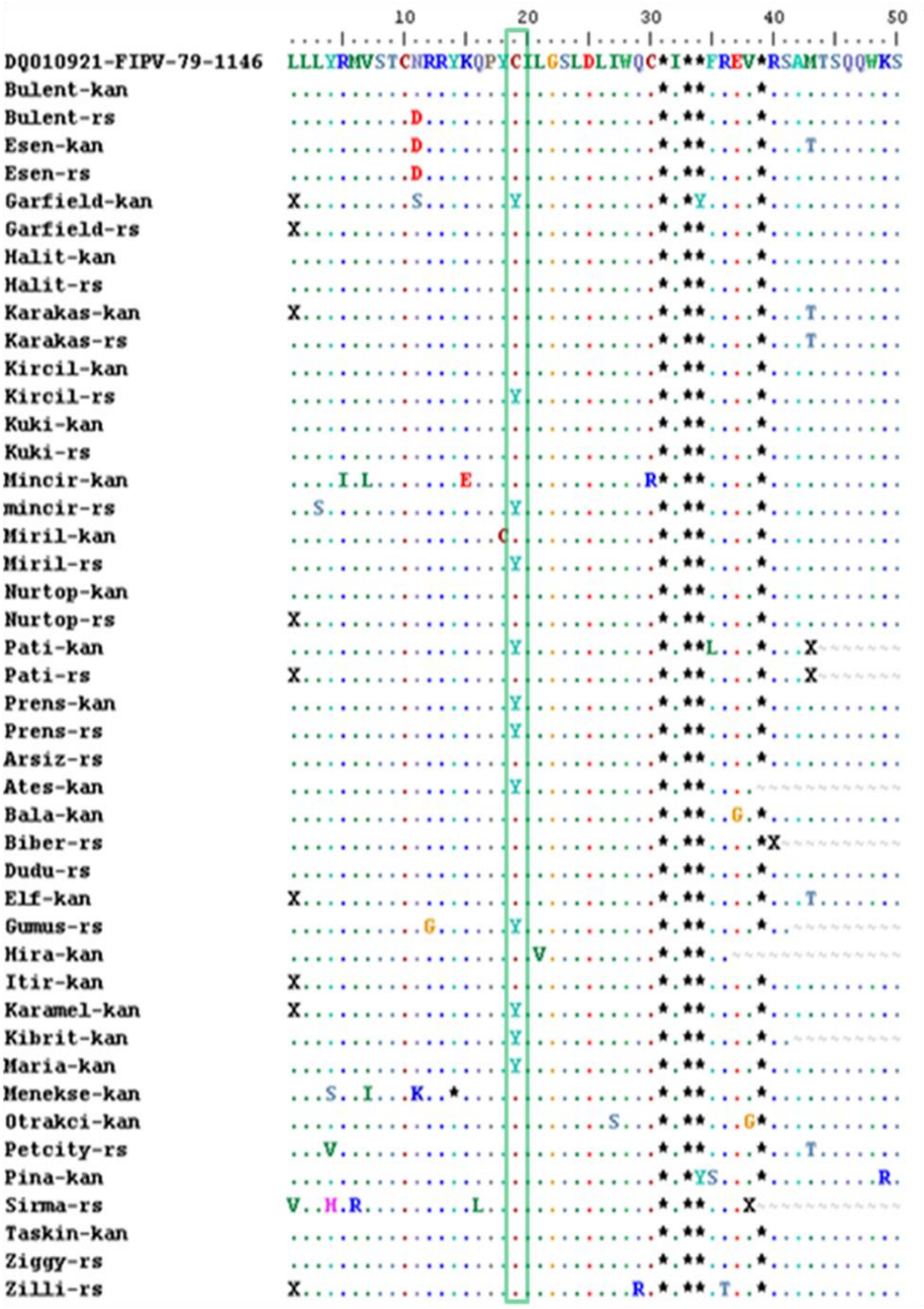
No	Örnek Adı		Semptom	Kan örnekleri			Rektal sürüntü örnekleri			
				GAPDH	M geni	3' UTR	GAPDH	M geni	3' UTR	Antikor ELISA sonuçları
1	TR-FCOV- 12	Pina	Asemptomatik	+	-	+	+	-	-	N
2	TR-FCOV- 14	Sırma	Asemptomatik	+	-	-	-	-	+	P
3	TR-FCOV- 16	Itır-fındık	Lenfadenopati	+	-	+	+	-	+	N
4	TR-FCOV- 19	Taşkın	Asemptomatik	+	-	+	+	+	-	N
*5	TR-FCOV- 22	Halit	Diğer	+	-	+	+	-	+	N
6	TR-FCOV- 30	Karamel	İshal	+	-	+	+	-	-	P
7	TR-FCOV- 31	Arsız	Ascites	+	+	-	+	-	+	N
8	TR-FCOV- 32	Bala	Asemptomatik	+	-	+	-	-	-	P
9	TR-FCOV- 33	Otrakçı	İshal	+	+	+	+	-	-	T.E.
*10	TR-FCOV- 50	Pati	Asemptomatik	+	-	+	-	-	+	P
11	TR-FCOV- 51	Hira	İshal	+	+	+	+	+	-	N
12	TR-FCOV- 54	Biber	Asemptomatik	+	-	-	-	-	+	N
13	TR-FCOV- 55	Kibrit	Asemptomatik	+	-	+	-	-	+	P
14	TR-FCOV- 58	Maria	Hepatitis	-	-	+	-	-	-	P
15	TR-FCOV- 66	Zilli 2	Poliüri/dipsi	-	-	-	-	-	+	T.E.
*16	TR-FCOV- 78	Kuki	Asemptomatik	+	+	+	-	-	+	N
17	TR-FCOV- 83	Petc	Asites	+	+	-	+	+	+	N
*18	TR-FCOV- 84	Bülent	Asemptomatik	+	-	+	-	-	+	N
19	TR-FCOV- 86	Dudu	İshal	+	-	+	-	-	+	N
20	TR-FCOV- 90	Ziggy	Asemptomatik	+	-	-	+	+	+	N
*21	TR-FCOV- 91	Esen	Diğer	+	-	+	-	-	+	P
22	TR-FCOV- 95	Elf	Asemptomatik	+	-	+	+	-	-	P
*23	TR-FCOV- 99	Karakaş	Asites	+	+	+	-	-	+	P
*24	TR-FCOV-114	Garfield	Diğer	+	-	+	+	-	+	N
25	TR-FCOV- 117	Menekşe	Asemptomatik	+	-	+	-	-	+	P
*26	TR-FCOV- 118	Miril	Horner send.	+	+	+	-	-	+	N
*27	TR-FCOV- 119	Mincir	Asemptomatik	+	-	+	-	-	+	N
*28	TR-FCOV- 120	Kirçil	İshal	+	-	+	-	-	+	P
*29	TR-FCOV- 123	Nurtop	Diğer	+	-	+	-	-	+	P
*30	TR-FCOV- 141	Prens	Asemptomatik	-	-	+	-	-	+	P
31	TR-FCOV- 147	Gümüş-V	İshal	+	-	+	-	-	+	P
32	TR-FCOV- 150	Ateş	Asites	+	+	+	-	-	+	P

* 12 adet hayvan hem kan hem rektal sürüntü örneği olarak çiftli test edilmiştir.

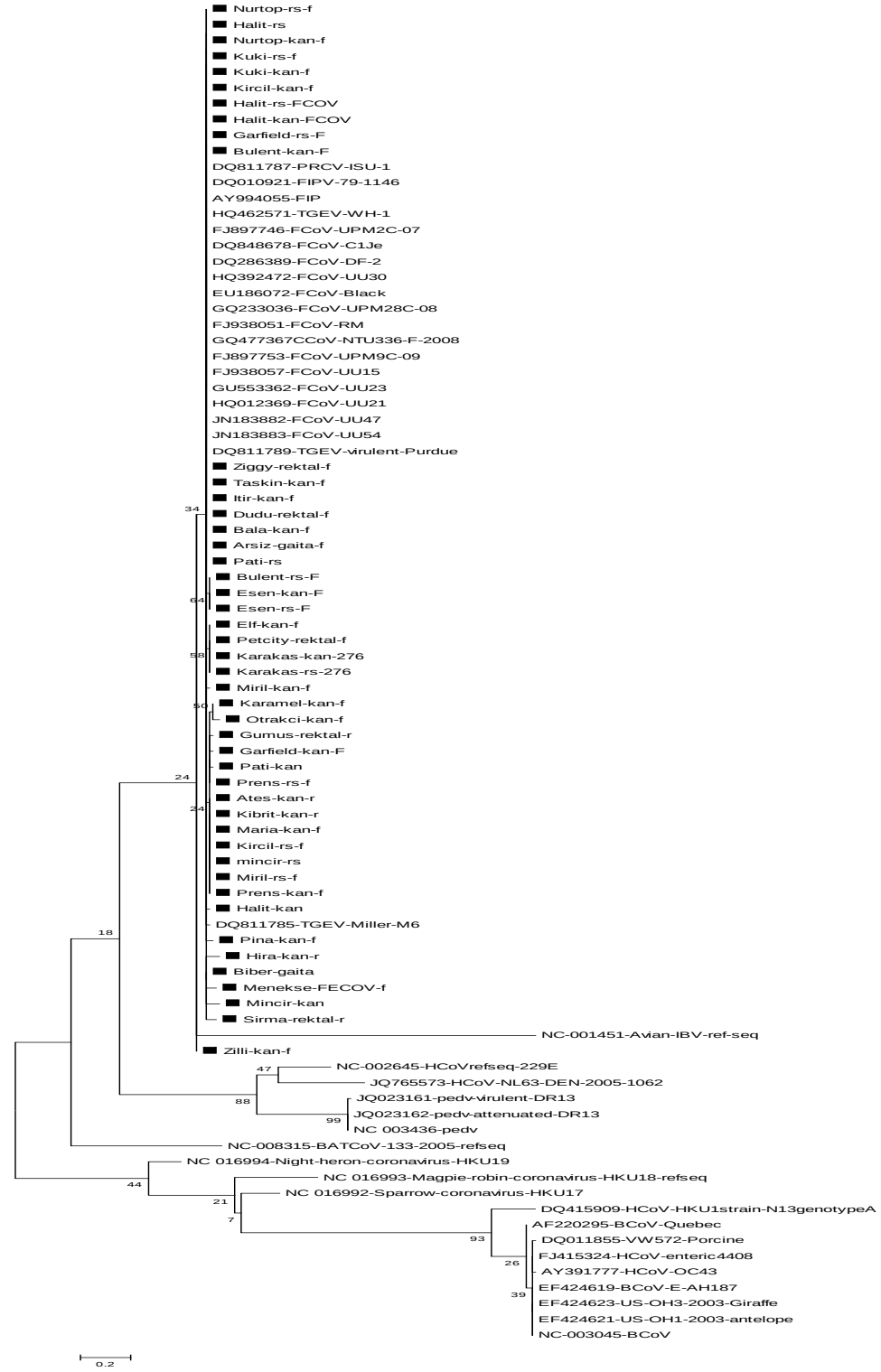
(T.E.= Test edilmedi, P=Pozitif, N=Negatif)



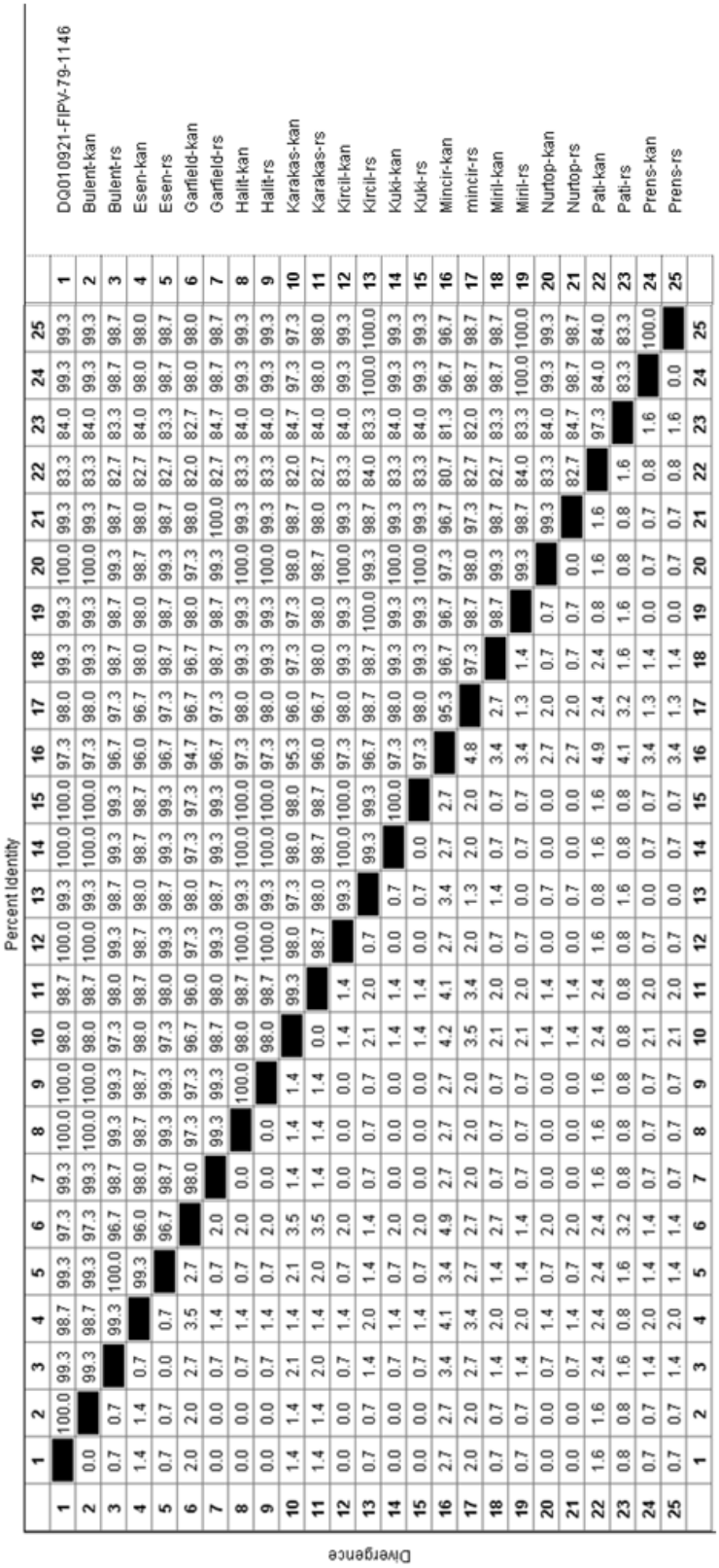
Şekil 3.2. Aynı hayvana ait kan ve rektal sürüntü örneklerinde saptanan FCoV'ların filogenetik analizi



Şekil 3.3. Dizin analizi yapılan FCoV' ların referans sekansa göre aminoasit farklılıkları



Şekil 3.4. Dizin analizi yapılan örneklerin filogenetik analizi



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1		100.0	99.3	98.7	99.3	97.3	99.3	100.0	100.0	98.0	98.7	100.0	99.3	100.0	100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	1 DQ010921-FIPV-79-1146
2	0.0		99.3	98.7	99.3	97.3	99.3	100.0	100.0	98.0	98.7	100.0	99.3	100.0	100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	2 Bulent-kan
3	0.7	0.7		99.3	100.0	96.7	98.7	99.3	99.3	97.3	98.0	99.3	98.7	99.3	99.3	96.7	97.3	98.7	98.0	99.3	98.7	82.7	83.3	98.7	98.7	3 Bulent-rs
4	1.4	1.4	0.7		99.3	96.0	98.0	98.7	98.7	98.0	98.7	98.7	98.0	98.7	98.7	96.0	96.7	98.0	98.0	98.7	98.0	82.7	84.0	98.0	98.0	4 Esen-kan
5	0.7	0.7	0.0	0.7		96.7	98.7	99.3	99.3	97.3	98.0	99.3	98.7	99.3	99.3	96.7	97.3	98.7	98.7	99.3	98.7	82.7	83.3	98.7	98.7	5 Esen-rs
6	2.0	2.0	2.7	3.5	2.7		98.0	97.3	97.3	96.7	96.0	97.3	98.0	97.3	97.3	94.7	96.7	96.7	98.0	97.3	98.0	82.0	82.7	98.0	98.0	6 Garfield-kan
7	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0		99.3	99.3	98.7	98.0	99.3	98.7	99.3	99.3	96.7	97.3	98.7	98.7	99.3	100.0	82.7	84.7	98.7	98.7	7 Garfield-rs
8	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0		100.0	98.0	98.7	100.0	99.3	100.0	100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	8 Halit-kan
9	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0		98.0	98.7	100.0	99.3	100.0	100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	9 Halit-rs
10	1.4	1.4	2.1	1.4	2.1	3.5	1.4	1.4	1.4		99.3	98.0	97.3	98.0	98.0	95.3	96.0	97.3	97.3	98.0	98.7	82.0	84.7	97.3	97.3	10 Karakas-kan
11	1.4	1.4	2.0	1.4	2.0	3.5	1.4	1.4	1.4	0.0		98.7	98.0	98.7	98.7	96.0	96.7	98.0	98.0	98.7	98.0	82.7	84.0	98.0	98.0	11 Karakas-rs
12	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4		99.3	100.0	100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	12 Kircil-kan
13	0.7	0.7	1.4	2.0	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	2.1	2.0	0.7		99.3	99.3	96.7	98.7	98.7	100.0	99.3	98.7	84.0	83.3	100.0	100.0	13 Kircil-rs
14	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.7		100.0	97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	14 Kuki-kan
15	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.7	0.0		97.3	98.0	99.3	99.3	100.0	99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	15 Kuki-rs
16	2.7	2.7	3.4	4.1	3.4	4.9	2.7	2.7	2.7	4.2	4.1	2.7	3.4	2.7	2.7		95.3	96.7	96.7	97.3	96.7	80.7	81.3	96.7	96.7	16 Mincir-kan
17	2.0	2.0	2.7	3.4	2.7	2.7	2.0	2.0	2.0	3.5	3.4	2.0	1.3	2.0	2.0	4.8		97.3	98.7	98.0	97.3	82.7	82.0	98.7	98.7	17 mincir-rs
18	0.7	0.7	1.4	2.0	1.4	2.7	0.7	0.7	0.7	2.1	2.0	0.7	1.4	0.7	0.7	3.4	2.7		98.7	99.3	98.7	82.7	83.3	98.7	98.7	18 Miril-kan
19	0.7	0.7	1.4	2.0	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	2.1	2.0	0.7	0.0	0.7	0.7	3.4	1.3	1.4		99.3	98.7	84.0	83.3	100.0	100.0	19 Miril-rs
20	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.7	0.0	0.0	2.7	2.0	0.7	0.7		99.3	83.3	84.0	99.3	99.3	20 Nurtop-kan
21	0.0	0.0	0.7	1.4	0.7	2.0	0.0	0.0	0.0	1.4	1.4	0.0	0.7	0.0	0.0	2.7	2.0	0.7	0.7	0.0		82.7	84.7	98.7	98.7	21 Nurtop-rs
22	1.6	1.6	2.4	2.4	2.4	2.4	1.6	1.6	1.6	2.4	2.4	1.6	0.8	1.6	1.6	4.9	2.4	2.4	0.8	1.6	1.6		97.3	84.0	84.0	22 Pati-kan
23	0.8	0.8	1.6	0.8	1.6	3.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1.6	0.8	0.8	4.1	3.2	1.6	1.6	0.8	0.8	1.6		83.3	83.3	23 Pati-rs
24	0.7	0.7	1.4	2.0	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	2.1	2.0	0.7	0.0	0.7	0.7	3.4	1.3	1.4	0.0	0.7	0.7	0.8	1.6		100.0	24 Prens-kan
25	0.7	0.7	1.4	2.0	1.4	1.4	0.7	0.7	0.7	2.1	2.0	0.7	0.0	0.7	0.7	3.4	1.3	1.4	0.0	0.7	0.7	0.8	1.6	0.0		25 Prens-rs
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	

Şekil 3.5. Aynı hayvana ait kan ve rektal sürüntü örneklerinda saptanan FCoV'ların benzerlik/farklılıkları

Sekans analizi yapılan örneklerde mutasyonların sebep olduğu amino asit değişikliklerini gösteren grafikte (Şekil 3.3) 44 saha örneğinin 12'sinde FIPV 79-1146 nolu virus komple genomu referenz alındığında 3'UTR bölgesinin 19. Amino asitinin Sistein (Cys-C)'den Tirozin (Try-Y)'e değiştiği dikkat çekici bulundu. Sistein ve tirozin polar, yüksüz, reaktif aminoasitler olmaları sebebiyle birçok proteinin üç boyutlu yapısının oluşturulmasında belirleyici rol oynarlar.

Örneklenen ve sekansı yapılan 3 kedi (Mıncır, Mırıl ve Kırçıl) aynı evde beslenen hayvanlar olup, bu hayvanların üçünün rektal sürüntü örneklerinde de anılan aminoasitlerin (C→Y) ısrarlı değişimi gözlendi. Ancak bu bölgede olan değişimlerin anlamlı olup olmadığı ileri araştırmaların konusudur.

3.1.4. Dizin Analizi ve Filogenetik Verileri Elde Edilen Hayvanlara İlişkin Serolojik Veriler

Çiftli sekansı yapılan örneklerden 6'sı FCoV antikorları yönünden pozitif bulundu. M geni yönünden RT-PCR ile pozitif olduğu belirlenen toplam 10 hayvandan biri antikor ELISA ile test edilemezken, 7'sinin kanında FCoV antikoru negatif, 2'sinde pozitif bulundu. Ayrıca M geni yönünden RT-PCR ile negatif, ancak 3'UTR yönünden pozitif bulunan ve filogenetik analiz yapılan 22 adet hayvandan 14'ünün kanında FCoV antikorlarının pozitif olduğu tespit edildi.

3.2. Serolojik Bulgular

3.2.1. ELISA sonuçları

Örneklenen 152 kediden 142 kedinin serum ve/veya plazma örneği elde edilmiş olup ELISA testinde bu örnekler kullanıldı.

Serum veya plazma örneği kullanılarak FCoV antikoru varlığı yönünden test edilen 142 kediden 59 adedi, %41,5, pozitif bulundu. Türkiye'de FCoV enfeksiyonuna karşı uygulanmakta olan ticari bir aşı bulunmadığından, belirlenen seropozitiflik doğal enfeksiyonun göstergesi olarak değerlendirildi. Elde edilen serolojik veriler, örneklenen hayvanların anket formlarında yer alan veriler ışığında incelendiğinde, çeşitli karma aşıların (Felocell®, Tricattrio® ...vb.) uygulandığı kedilerde, aşı uygulaması yapılmamış olanlara oranla, FCoV enfeksiyonuna karşı gelişen antikor yanıtın daha yüksek olduğu tespit edildi ve bu durum istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (p=0.011).

ELISA testi sonuçlarının yaş gruplarına göre değerlendirilmesinde FCoV negatif hayvanlar sıklıkla 0-1 yaş arasında bulunurken (50/83), pozitif hayvanların 13 aylıktan büyük kediler olduğu belirlendi (32/59) (p=0.023).

Hayvanların diğer enfeksiyonlara karşı aşılı olup olmama durumuyla hastalık semptomları arasında bir ilişki olup olmadığı Ki-kare testi ile sorgulandığında; FCoV harici enfeksiyonlara karşı aşılı hayvanların daha çok asites gösterdiği, aşısız olanların ise çoğunlukla asemptomatik oldukları ortaya konulup bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.034). FCoV antikorları varlığı saptanan kedilerin, FCoV enfeksiyonları haricinde aşılanmış olmaları Ki-kare

testi ile anlamlı bulundu (p=0.011).

3.3. RT-PCR ve ELISA sonuçlarının beraber değerlendirilmesi

RT-PCR sonuçlarına göre feline GAPDH pozitif olmayan 18 örneğin 8 adedi FCoV antikorları yönünden pozitif, 8 adedi antikor negatif bulundu. Bunlardan 2 adedi ise ELISA testine tabii tutulamadı.

Feline GAPDH pozitif olup RT-PCR ile negatif olan 15 örnekten ise sadece 5 adedinin antikor ELISA ile de negatif olduğu belirlenirken, 8 örnek antikor pozitif bulundu. Geri kalan 2 örnek ise test edilemedi.

Bu çalışmada FCoV enfeksiyonu hem virolojik hem de serolojik olarak değerlendirilmiş olup, araştırılan kediler arasında enfeksiyonun prevalansı %96 (127/132) olarak tespit edildi.

Çizelge 3.7: FCoV RT-PCR pozitif örneklerin antikor sonuçlarıyla beraber değerlendirildiğindeki rektal sürüntü FCoV pozitif/ negatifliklerinin sayısal verileri

	ANTİKOR POZİTİF		ANTİKOR NEGATİF		TEST EDİLEMEYEN	
	KAN M (+)	KAN M (-)	KAN M (+)	KAN M (-)	KAN M (+)	KAN M (-)
R.S. M VE/VEYA 3' UTR (+)	17	19	19	35	0	2
R.S. M VE/VEYA 3' UTR (-)	3	6	10	4	2	2
TOPLAM	20	25	29	39	2	4

Çizelge 3.7.'de de görüldüğü üzere antikor pozitif olup rektal sürüntü örneği M ve/veya 3' UTR primerleri ile pozitiflik vermiş örnek sayısı 36 iken (36/45, %80), antikor negatif olup rektal sürüntü örneğinde M ve/veya 3' UTR primerleri ile pozitiflik vermiş örnek sayısı 54(54/68, %79)'tür. Rektal sürüntü örneğinde M ve/veya 3' UTR primerleri ile pozitiflik veren kediler saçıcı kabul edilmişlerdir.

4. TARTIŞMA

Dünya üzerinde 8 milyar insan ve 600 milyondan fazla evcil kedi aynı habitatı paylaşmaktadır. Arkeolojik verilere göre yaklaşık 9500 yıl önce başlayan evcilleştirme sonucunda kediler ve insanlar birbirleriyle oldukça yakınlaşarak, aynı yaşamı paylaşmaya dönüşen bir süreci beraberce geçirmişlerdir. Günümüzde giderek artan pet hayvanı beslemesi de bu birlikteliğin bir sonucudur. Bu yaşam birlikteliği, hayvan sağlığı ile ilgili konuları gündeme getirmiş ve veteriner hekimlerin birçok hastalık yanı sıra özellikle kedilerde gözlenen viral hastalıklar konusuna da eğilmelerini sağlamıştır.

FCoV'lar, evcil ve yabani kedigiller için yaşam kalitesini ve süresini direkt ya da indirekt etkileyen önemli viral enfeksiyonlara neden olmaktadırlar. Özellikle apatojen formdan patojen olan mutant forma geçişleri hakkında, tanımlandıkları zamandan günümüze kadar sayısız araştırmaya konu edilmişlerdir. Kedilerin tekli bakım koşullarında tutulmaları durumunda kullanımı tercih edilmeyen bir aşı üretilmiş olmakla birlikte, aşı kullanıldığında hastalık insidensinin azaldığına dair veriler fazla sayıda değildir. Ancak FIP insidensinin FECV/FIPV mutasyon oranından direkt etkilendiği bildirilmiştir (Vennema ve ark.,1998). Bu bağlamda; bu çalışmada Türkiye'deki çeşitli yaş, ırk, cinsiyet, farklı yaşam koşuluna sahip, klinik bulgulu ve FCoV harici diğer etkenlere karşı aşı durumları bildirilen kedi populasyonlarında FCoV enfeksiyonlarının varlığı, tipi (FECV/FIPV), viral insidensi ve seroprevalansı sorgulandı. Ayrıca RT-PCR ile pozitif bulunan bazı saha örneklerinin dünyadaki hemcinsleri ile moleküler düzeyde karşılaştırması yapıldı.

Bu çalışmada FCoV enfeksiyonu hem virolojik hem de serolojik olarak değerlendirilmiş olup, araştırılan kediler arasında enfeksiyonun prevalansı

%96 (127/132) olarak tespit edildi. Enfeksiyonun Türkiye'de evcil kediler arasında oldukça yüksek prevalansta bulunmasını destekleyen çalışmalar (Oğuzoğlu ve ark.,2010) ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

FCoV enfeksiyonlarının tanısında nested RT-PCR tekniği kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada (Herrewegh ve ark., 1995), FIP'te monosit ve makrofajların enfeksiyonunu "*anahtar patojenik olay"* olarak ifade etmiş ve avirulent FCoV'ların sindirim sisteminde lokalize olduğu, intestinal epitelyum ve bölgesel lenf yumrularından ileriye gidemediği belirtilmiştir. FCoV genomunun 3'UTR bölgesine yönelik primerleri tasarlayan araştırmacılar (Herrewegh ve ark., 1995) asemptomatik FCoV taşıyıcılarının belirlenmesinde ve enfeksiyonun tanısında bu testin kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Coronaviruslar hakkında yapılan bir başka çalışmada (Williams ve ark., 1999); pozitif iplikli RNA viruslarının 3'UTR'lerindeki sekonder ve tersiyer yapıların RNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunda rol aldığı, ayrıca bu bölgede yer alan *pseudoknot* yapının ve konserve saç tokası özelliğinin filogenetik analizde kolaylık sağladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada hem tanı hem de moleküler karakterizasyon amacıyla Herrewegh ve ark.'nın (1995) önerdiği 3'UTR bölgesine spesifik primerler kullanıldı. Çalışmada kullanılan kan örnekleri GAPDH negatif bulunan kediler hariç tutularak değerlendirilen 134 kedinin 119'u (%88,80) 3'UTR ve M geni primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR ile FCoV enfeksiyonu yönünden pozitif bulundu.

Mutant FCo virusun yeni bir tropizm kazanarak monosit ve makrofajlarda yüksek titrede replike olduğu bilinmektedir (Stoddart ve Scott, 1989). Yapılan çalışmalarda (Lai ve Cavanagh, 1997; Zhang ve ark., 1994) FCoV suşlarının makrofajları enfekte edebilme kabiliyetinin virulensle ilişkisi; avirulent FCoV'ların daha az sayıda hücreyi enfekte ettiği ve virulent viruslara göre daha düşük titrede kaldığı şeklinde belirtilmiştir. Avirulent FCoV'lar, viral replikasyonun sağlanmasında ve diğer makrofajlara yayılımda öncüdürler.

Simons ve ark. (2005) monosit ve makrofajların enfeksiyonunun FIP tanısı için önemli olduğunu ifade ederek, PCR temelli bir tanı tekniği geliştirmişlerdir. FCo virusla enfekte hücrelerde subgenomik mRNA'lar sentezlenmektedir. Her bir mRNA, genomun 5' ucundan alınmış 60-98 nükleotidlik bir lider sekansa sahiptir. Simons ve ark. (2005) PCR temelli bu tanı tekniğinde ürün büyüklüğü 295 baz çifti olan spesifik primerler kullanmışlardır. Bu primerler FCoV M genine yönelik olup, mRNA'nın lider sekansını (Lai ve Cavanagh, 1997) ve bu genin korunaklı bölgesini içermektedir. Bu primerler kullanılarak tip II ve tip I FCoV yanı sıra; canine ve porcine kökenli Coronaviruslar da tespit edilebilmiştir. Ayrıca araştırmacılar mRNA temelli PCR tanısının, genomik RNA tanısını sağlayan önceki CoV RT-PCR'larına göre daha uygun bir metot olduğunu belirtmişlerdir. Bu test, sadece replike olan virusu tanıması nedeniyle daha spesifik ve çekirdekli kan hücrelerinden analiz yapılması sebebiyle de daha sensitif olarak bildirilmiş, ayrıca RNA izolasyonunun etkin şekilde gerçekleştiğini göstermek için ve aynı zamanda verimliliği kontrol etmek amacıyla kedi genomuna yönelik GAPDH primerleri ile birlikte kullanılmıştır. Bu çalışmada da FIP enfeksiyonunun varlığı Simons ve ark.'nın (2005) bildirdiği M geni spesifik primerler ve GAPDH primerleri kullanılarak araştırıldı. Araştırılan 134 adet kedi kan örneğinin 51'i (%38,06) M geni primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR ile pozitif bulundu.

Çalışmada FCoV enfeksiyonlarının tespiti için RT-PCR ile 3'UTR'ye yönelik primerler kullanılarak yapılan virolojik tanıda %78,35 (79/134) oranında pozitiflik belirlenmiş olmasına rağmen, sadece M geni spesifik primerler kullanımı ile %38,06'lık pozitiflik saptanması; tek bir primer çiftinin kullanımının tanısal anlamda yanlış negatifliklere neden olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

FIP'te ölüm oranlarının çoğunlukla 3-16 ay yaşlı kedilerde görüldüğü tespit edilen çalışmalara (Foley ve ark., 1997; Pedersen, 2009) atfen enfeksiyonun sıklıkla 2 yaşın altındaki kedilerde görüldüğü bilinmektedir. Foley ve ark. (1997) kastre edilmemiş erkek, genç ve safkan kedilerde yaptıkları araştırmada FIP enfeksiyonunun daha fazla oranda görüldüğünü belirtmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada (Norris ve ark., 2005) ise örneklenen kediler arasında yaş ve ırk yönünden herhangi bir predispozisyon olmadığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada örneklenen kedilerin yaş, ırk ve cinsiyet durumlarının her biri teker teker değişken olarak tutulduğunda FCoV enfeksiyonlarının görülme sıklığı ile aralarında anlamlı bir istatistiki ilgi bulunamamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmada kullanılan materyal sayısının diğer çalışmalara göre az olmasının çalışma sonuçlarını sınırlandırmış olabileceği ve ayrıca örnekleme grubundaki ırkların dağılımının üniformite göstermemesinin bu verinin oluşumunda önem taşıyabileceği düşünülmüştür.

FIP enfeksiyonunun çoklu ve tekli bakım koşullarındaki sıklığı hakkında farklı bildirimler bulunmaktadır. Ancak araştırmacılar tarafından kabul gören durum; FECV enfeksiyonunun çoklu bakım koşullarında naklinin kolaylığıdır. Bu şekilde bakılan FECV saçıcılarının belirlenip, ortamdan uzaklaştırılmalarının FIP enfeksiyonu riskini azalttığı ifade edilmektedir (Foley ve ark., 1997). Bu araştırmada kedilerin bakım koşulları ve FCoV enfeksiyonu varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,351$). Ancak çoklu ortamda yaşayan kedilerde daha çok asemptomatik FCoV enfeksiyonu tespit edildiği, bunun yanı sıra tekli bakım koşulunda asites klinik bulgusunun öne çıktığı ve özellikle semptom göstermeyen FCoV taşıyıcılarının çoklu bakım koşullarında yaygın bulundukları tespit edilmiş ve bu bulgular istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.013$). Bu bulgular, Türkiye'deki FCoV M geni mRNA'sı araştırılan evcil kedilerde yapılan bir başka çalışmanın (Can-Şahna ve ark.) sonuçları ile arz etmektedir.

Yaş form FIP'in karakteristik klinik semptomu olan asites, bu çalışmada da FIP'li hayvanların gösterdiği en tipik klinik bulgu olarak öne çıkmaktadır. Asites bulgusunun FIP enfeksiyonu için diğer klinik semptomlara göre istatistiki olarak da fark yaratan bir semptom olduğu tespit edilmiştir (p=0.001). Ancak asemptomatik hayvanlarda da FCoV nükleik asiti tespiti yapılmış olduğundan, bu enfeksiyonun tanısı yönünden klinik bulgu varlığının bağlayıcılığının diğer tanısal testlerle desteklenmesi gerektiği düşünülmüştür.

Kedilerin diğer enfeksiyonlara karşı aşılı olup olmama durumu ile hastalık semptomları arasında Ki-kare testi ile yapılan değerlendirmede aşılı hayvanların daha çok asites gösterdiği, aşısız olanların ise daha ziyade asemptomatik oldukları ortaya kondu (p=0.034). Bununla beraber FCoV harici diğer etkenlere karşı aşılı olma durumu ve antikor pozitifliği Ki-kare testi ile karşılaştırıldığında, FCoV'a karşı antikor pozitif tespit edilen kedilerin çoğunlukla başka ajanlara karşı aşılı oldukları ve bunun istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu belirlendi (p=0.011). Ayrıca yapılan anketlerden edinilen bilgiye göre FCoV antikorları yönünden araştırılan 142 kedinin 77'sinin diğer enfeksiyonlara karşı aşılandığı ve bunlardan 40'ının FCoV antikorları yönünden de pozitif olduğu tespit edildi (p=0.006).

Tespit edilen bu anlamlı farklılık; enfeksiyon spekturumu araştırılmadan önce kedileri diğer enfeksiyonlara karşı aşılamanın FCoV enfeksiyonlarında antikor titresini arttırıcı yönde etkisinin olup olmadığı, varsa nasıl etki ettiği şeklinde bir soruyu ortaya çıkarmaktadır. FIP; T hücre yanıtı aracılı humoral immunitenin olduğu bir enfeksiyon tablosuna sahiptir (Pedersen ve Black, 1983). Bu nedenle T hücre yanıtını baskılayan birçok enfeksiyon (örneğin FeLV) FIP'in klinik insidansını arttırıcı yönde etki etmektedir (Cotter ve ark, 1975; Hardy, 1982, Pedersen ve ark., 1977). Yapılan çalışmalarda kedilerde FCoV'a karşı antikor artışının, Arthus tipi aşırı duyarlılık reaksiyonuna sebep olarak yaş form FIP gelişimini hızlandırabildiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada

FCoV enfeksiyonu harici etkenlere karşı (örneğin FeLV, FHV, FCaV, FPV vb.) aşılanma durumu ve bu kedilerin kan serumlarında FCoV antikorlarının anlamlı düzeyde yüksek bulunması arasında bir korelasyon olup olmadığı sorusu, söz konusu hayvanların aşılama öncesi enfeksiyon geçmişleri de bilinmediğinden cevaplanamamış, ancak Coronavirus antikor titreleri yüksek kedilerde FIP enfeksiyonunun gelişme riskinin yüksek olduğunu gösterir çalışmalar (Pedersen, 2009) da dikkate alındığında konunun ileride deneysel enfeksiyon temelli çalışmalarla daha detaylı araştırılması gerekliliği öngörülmüştür.

Yapılan bazı çalışmalarda; virus saçılımı ile Coronavirus antikor titresi arasında bir bağlantı olduğu bildirilmiştir (Pedersen, 2009). Buna göre laboratuvar sonuçları arasında farklar olmakla birlikte; antikor titreleri ≥1:100 olan kedilerin, ≤1:25 antikor titresine sahip olanlara göre virus saçılımına daha yatkın oldukları tespit edilmiştir. FCoV antikorlarının FECV ve FIPV enfeksiyonları arasında bir ayrım yapamadığı da bildirilmiştir (Pedersen, 2009). Her ne kadar 1:1600'den büyük antikor titreleri FIPV enfeksiyonunu çağrıştırsa da, sağlıklı görünümlü ancak FCoV ile enfekte bir çok kedide de tespit edilen yüksek antikor titreleri yanıltıcı olabilmekte ve bu anlamda düşük bir tanısal değere sahip kabul edilmektedir (Paltrinieri ve ark., 1998; Sparkes ve ark., 1991). Ayrıca antikor titrelerinin subklinik aşamadan klinik aşamaya geçerken progressiv şekilde arttığı bildirilmiştir (Pedersen, 1987, 2009).

Bu çalışmada antikor ELISA testi sonuçlarında 1:30'luk sulandırmalarda OD değeri 1.000'den büyük 21 örneğin RT-PCR sonuçları karşılaştırıldığında, 7 kan örneğinin GAPDH ve M geni primerleri ile pozitif (7/21, %33,3) olduğu (yani FIPV ile enfekte), ve bunların 6 adedinin rektal swap örneklerinin M ve/veya 3'UTR primerleri ile de pozitif olması sebebiyle virus saçıcısı oldukları kanaatine varılmıştır. Geri kalan 14 örnekten 11 adedi (11/21, %52,4) kan ve/veya rektal sürüntülerinde 3'UTR primerleri ile pozitif

bulunmuş bunlardan da 9 tanesi rektal sürüntü örneklerinde pozitif tespit edilerek CoV saçıcısı oldukları düşünülmüştür. Ancak bu örneklerden 3 tanesinin kan GAPDH PCR'ları negatif sonuç verdi. Antikor titresi yüksek 21 örnekten sadece 3 adedi (3/21, %14,2) RT-PCR ile negatif tespit edildi. Bu sonuçlar, antikor titresi yüksek olan kedilerde virus saçılımının yüksek olabileceği hipotezi ile paralel (15/21, %71) bulundu.

Bu çalışmada antikor negatif olarak değerlendirilen 83 adet örneğin RT-PCR sonuçlarına bakıldığında, bunlardan 29 adedinin (29/83, %34,9) M geni primerleri ile pozitif bulunduğu (yani FIPV ile enfekte), bu pozitif örneklerin 19 adedinin de rektal sürüntülerinde M ve/veya 3'UTR primerleri ile pozitif oluşu nedeniyle virus saçıcısı oldukları tespit edildi. Pedersen (2009), FIP enfeksiyonunun yaş formundaki kedilerde ölüme yakın dönemde antikor titrelerinde ani düşüşler tespit edildiğini bildirmiş olup, RT-PCR ile pozitif bulunan ancak antikor yanıtı negatif olan bu 29 hayvandaki FIP enfeksiyonunun ileri dönemlerde ve hatta son dönemde olduğu ihtimalini akla getirdi. FIPV pozitif olan bu 29 hayvanın klinik bulgularının asemptomatik (n=9), asites (n=6), gingivitis (n=1), horner sendromu (n=2), ishal (n=4), kronik zayıflama/yüksek ateş (n=1), körlük (n=1), tetrapleji (n=1), iştahsızlık (n=1), üst solunum yolu enfeksiyonu (n=1) ve inkoordinasyon (n=2) olduğu dikkate alınırsa; hastalığın son dönemlerinde sadece yaş formda değil kuru formda da antikor titrelerinin düşebileceğini ortaya koydu. Ayrıca bu 29 kediden 26'sının 2 yaşın altında oluşu ilgi çekici bir veri olarak bulundu. Marioni-Henry ve ark.'nın (2004) merkezi sinir sistemi bulguları olan 2 yaş altı kedilerde sıklıkla FIP pozitifliği tespit ettikleri bir çalışmadaki verilerle bu çalışmadaki veriler uyum gösterdi.

Antikor negatif olan örneklerden 44'ü (31/83, %37) yapılan RT-PCR'da sadece 3'UTR primerleri ile pozitiflik vermiş olup, bu örneklerden 38'i rektal sürüntü örneklerinde pozitiflik verdiğinden virus saçıcısı olarak kabul edildiler.

Antikor negatif olan kedilerin 10 adedi (10/83) RT-PCR ile de negatiflik verdiğinden bu hayvanların FCoV enfeksiyonu yönünden negatif olduğu kabul edildi. Bu sonuçlara göre; antikor yanıt olarak negatif bulunan ancak RT-PCR ile pozitif tespit edilen hayvanların; bu enfeksiyöz ajanla karşılaşmış olduğu ve enfeksiyonun erken döneminde örnekleme yapıldığı şeklinde yorumlandı. Çalışmada kediler bir kere örneklendiği ve enfeksiyon takibi yapılmadığından, bu kedilerdeki klinik FCoV enfeksiyonunun akıbeti konusu aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada sekansları yapılan tüm örnekler filogenetik analiz sonuçlarına göre FCoV olarak tanımlandı. Söz konusu analizlerde, 12 kediye ait kan ve rektal sürüntü örnekleri ile 20 kediye ait kan veya rektal sürüntü örnekleri olmak üzere toplam 32 kediye ait 44 sekans dizini araştırıldı. İlgili gen bölgesi yönünden yapılan araştırmalarda; örneklerin büyük çoğunluğunda ve özellikle de 9 adet kan ve rektal sürüntü çiftinde nükleotid düzeyinde heteroloji tespit edilmiş olup, bu örneklerin sekans analizlerinde aminoasit farklılıklarına yol açabilecek mutasyonlar olduğu belirlendi. Hatta bu mutasyonel farklılıkların bir sonucu olarak dizin analizi yapılan bir örneğin (Zilli) filogenetik ağaçta avian suşlarına daha yakın yer aldığı gözlendi.

Ülkemizdeki kedilerden elde edilen CoV'ların moleküler karakterizasyonunun hedeflendiği bu çalışmada, sekans analizi sonuçlarına göre FCoV olduğu belirlenen örnekler; canine ve porcine kökenli Grup 1 Coronavirusları ile yakın, Grup 1 Coronaviruslar içerisinde yer alan insan ve Grup 2 Coronaviruslar içinde yer alan insan ve bovine kökenli etkenler ile de daha uzak genetik ilişkili bulundu.

Avian suşlarla yakın antijenik ilişkili bulunan bir sekansın ait olduğu kedinin (Zilli, İran kedisi, 6 yaş), aşırı zayıflama, poliüri ve polidipsi şikayeti ile kliniğe başvurulduktan bir ay sonra ötenazi yapıldığı bilgisi alındı. Bu kedinin evde beslendiği, sahiplerinin kedinin hastalandığı dönemde gribal enfeksiyon semptomlu olduğu, evde aynı dönemde bir muhabbet kuşunun da öldüğü bilgileri not edilmiştir. Kliniğe bir ay sonra getirildiğinde solunum yetmezliği ve hafif epileptik nöbetler geçirdiği de bildirilmiştir. Sekans sonuçları ile klinik tablo ve anamnez arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüş, ancak ne evdeki bireylerden ne de ölen kuştan örnekleme yapılmadığından bu konuda kesin bir veri elde edilememiştir. Woo ve ark. (2009) bu tür örneklerin türler arası geçişe kanıt teşkil edeceğini bildirmiş olup, bu örnek ve benzerlerinin ileri araştırmaların konusu olduğu kanaatine varıldı.

Test edilen bazı kedilerin (örneğin Taşkın, Ziggy) rektal sürüntü örnekleri M geni primerleri ile pozitif bulunmuş olmasına rağmen, aynı kedilerin kan örneklerinin M geni yönünden negatif olduğu tespit edildi. Bu durum; hayvanların bağırsak epitelinde virusun replike olduğu, ancak kan dolaşımında bulunmadığı şeklinde yorumlandı. Bu çalışmada; M geni primerleri sadece kan örneklerinde değil, rektal sürüntü örneklerinde de pozitif bulgular verdi. Kan örneklerinde FIP virusunun tespiti için Simons ve ark. (2005) M genine yönelik tasarladıkları tanı metoduna benzer şekilde, Herrewegh ve ark. (1997) FCoV'ların mRNA'sının tespiti için N genine yönelik tasarlamış oldukları primerler ile gastrointestinal kanalda viral replikasyonu tespit etmişler ve virusun tipini belirlemek yerine, enfeksiyon varlığını bulmayı hedef edinmişlerdir. Bu çalışmadaki kan örnekleri M geni primerleri ile negatif bulunurken, aynı kedilere ait rektal sürüntü örneklerinin pozitif bulunması, Herrewegh ve ark.'nın (1997) çalışması ile uyumlu olup, gastrointestinal kanalda viral replikasyonun tespitinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bu yönüyle Simons ve ark.'nın (2005) tasarladıkları M geni primerlerinin sadece kan örnekleri için kullanılmasının FCoV enfeksiyonlarının tanısı için yetersiz olduğu, RT-PCR ile rektal sürüntü

örneklerinin de test edilmesi gerektiği, bu tür olgularda sonuçların antikor ELISA testleri ile de desteklenmesi gerektiği ve bu hayvanların düzenli aralıklarla takiplerinin yapılmasının uygun olacağı kanaatine varıldı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışma, 2010-2012 yılları arasında örneklenen 152 adet evcil kedide CoV enfeksiyonu yaygınlığını, seroprevalansını ve sirküle olan virusların moleküler karakterizasyon sonuçlarını içermektedir.

Bu çalışmadaki verilere göre;
-FCoV enfeksiyonlarının ülkemizdeki kedilerde oldukça yaygın bulunduğu,

-Çoklu bakım koşullarında asemptomatik FCoV taşıyıcılarının belirlenmesinde RT-PCR'da sadece M geni primerlerinin yeterli olmadığı, 3'UTR'ye yönelik primerlerin de kombine kullanımının gerektiği,

-FCoV enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında kan ve rektal sürüntü örneklerinin beraberce kullanılması gerektiği,

-Coronavirusların 3'UTR bölgesine yönelik olan primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda, ülkemizde seyretmekte olan FCoV suşlarının dünyada sirküle olan diğer feline coronaviruslar gibi *alpha coronaviruslar* ile oldukça yakın antijenik ilişkide olduğu,

- FECV'un mutant formu FIPV'nun da bu çalışma sonuçlarına göre ülkemizdeki kedilerde %33,55 oranda gözlenen ve sistemik enfeksiyona neden olan FCoV türü olduğu tespit edildi.

Bu sonuçlara göre ;
- FCoV dışındaki viral etkenler yönünden aşı uygulanmış kedilerde FCoV antikorlarının istatistiksel olarak yüksek bulunmuş olması, bu kediler için FIP enfeksiyonunun gelişme riski olabileceği ihtimalini kuvvetlendirdiğinden, FCoV harici viruslarla enfeksiyon/aşılama ile FIP gelişiminin tetiklenmesinin

mümkün olup olmadığının deneysel enfeksiyon temelli çalışmalarla daha detaylı araştırılması,

- Bu çalışmada moleküler karakterizasyon amacıyla kullanılan 3'UTR bölgesinden elde edilen saha viruslarına ait dizinler antijenik farklılıkları ortaya koymakla birlikte, analizi yapılan bölge oldukça küçüktür. CoV'ların S, 7ab ve 3abc bölgelerindeki moleküler analizlerin gerek serotip ayrımı ve gerekse saha viruslarının patojenite özelliklerinin daha detaylı ortaya konulabilmesine olanak sağlayacağından; ilerideki çalışmalarda kullanımı önerilmektedir.

ÖZET

Türkiye'deki Evcil Kedilerde Feline Coronavirus Epidemiyolojisi Ve Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışmada, evcil kedilerin önemli hastalıklarından birine sebep olan FIP ve bu virusun öncül formu olan FECV enfeksiyonlarının yaygınlığının araştırılması ve sahadaki suşların 3'UTR gen bölgesi hedef alınarak moleküler karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 152 kedi kullanıldı. Olgular yaş,ırk, cinsiyet, bakım ve besleme koşulları, aşılı olup olmama durumları ve klinik bulgular yönünden anket soruları eşliğinde değerlendirildi.

Bu veriler ışığında kedilerde FCoV enfeksiyonlarının yaygın olduğu,virusların yaş ya da cinsiyet ayrımı gözetmediği, evde yada sokakta bakılan kedilerin hepsinde her iki enfeksiyonun da görülebildiği ancak birden fazla kedinin bulunduğu ortamlarda FIP enfeksiyonun daha çok asemptomatik seyrettiği, FIP enfeksiyonunda diğer araştırmacılarca belirtildiği üzere ascites bulgusunun sıklıkla gözlendiği ortaya konulmuştur.

ELISA sonuçları ile yaş, ırk, cinsiyet, bakım ve besleme koşulları arasında bir korelasyon bulunmasa da aşılı hayvanların FCoV'a karşı oluşan antikor titrelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Uygulanan PCR'lar sonucunda FCoV tanısında 3'UTR primeri ile beraber M geni primerlerinin daha net sonuç verdiği belirlenmiştir. Dizin analizlerine göre Türkiye'de sirküle etmekte olan FCoV'lar dünyadaki diğer FCoV'lar ile benzerlik göstermiştir. Ancak saha suşlarından elde edilen bir örneğin filogenetik ağaçta Avian Coronavirus suşlarına yakın yer bulması evrimsel temelde değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Epidemiyoloji, Feline Coronavirus, Moleküler, Moleküler filogeni, RT-PCR

SUMMARY

Feline Coronavirus Epidemiology And Molecular Characterization Among Domestic Cats In Turkey

In this study, enlucidating not only the prevalance of FIP, a devastating disease of cats, and its precursor form FECV but also molecular characterization of the viruses with 3' UTR based RT-PCR and sequencing were aimed.

During this study 152 cats were sampled. Cats were grouped according to the information collected from the questionnaires filled by the owners on age, breed, gender, housing, environment and vaccination status.

These questionnaires revealed that FCoV infection was seen widespread in cat populations, diseases could be caused by both of the viruses regardless of age, gender and housing (indoor /outdoor). Likewise other researhes ascites is the common clinical symptom of FIP. On the contrary cats living in multicat households were usually asymptomatic

ELISA results and age, breed, gender housing and environment was not correlated with one another, but on the other hand higher antibody titres against FCoV were shown in vaccinated animals.

The PCR results indicated that not only the 3' UTR primers but also the M gene primers should be used in order to determine the FCoV. The sequence analysis pointed out the FCoV's in Turkey, were genetically related to the other FCoV's worldwide. On the other hand, in the phylogenetic tree, a sample were positioned closer than avian coronaviruses instead of feline, supposing the evolutionary aspects of the viruses.

Key words: ELISA, Epidemiology, Feline Coronavirus, Molecular, Molecular phylogeny, RT-PCR

KAYNAKLAR

ADDIE, D.D., JARRETT, O. (1992). A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. *The Veterinary record* **130**, 133-137.

ADDİE, D.D., SCHAAP, I.A., NICOLSON, L., JARRETT, O. (2003). Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *J Gen Virol* **84**, 2735-2744.

ADDIE, D.D., TOTH, S., HERREWEGH, A.A., JARRETT, O. (1996). Feline coronavirus in the intestinal contents of cats with feline infectious peritonitis. *The Veterinary record* **139**, 522-523.

BARNETT, O.W. (1993). Modern Technology Improves Plant-Virus Taxonomy or Melding the Molecular and Classical. *Phytopathology* **83**, 33-34.

BERGMANN, C.C., LANE, T.E., STOHLMAN, S.A. (2006). Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat Rev Microbiol* **4**, 121-132.

BONADUCE A. (1942). Infektiöse pleuritis der katzen. *Nuova Vet.* **21**, 32

BROWN, M.A., TROYER, J.L., PECON-SLATTERY, J., ROELKE, M.E., O'BRIEN, S.J. (2009). Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerg Infect Dis* **15**, 1445-1452.

CAN-SAHNA, K., SOYDAL ATASEVEN, V., PİNAR, D., OGUZOGLU, T.C. (2007) The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *Journal of feline medicine and surgery,* **9**, 369-372.

CHASTAIN, M., TINOCO, I., JR. (1991). Structural elements in RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology,* **41**, 131-177.

CHRISTIAN, P.D., SCOTTI, P. (1994). A Suggested Taxonomy and Nomenclature for the Cricket Paralysis and Drosophila-C Virus Complex. *Journal of Invertebrate Pathology* **63**, 157-162.

COLEY, S. E., LAVI, E., SAWICKI, S. G., FU, L., SCHELLE, B., KARL, N., SIDDELL, S. G., AND THIEL, V. (2005). Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol* **79**(5)**,** 3097-106.

COTTER, S.M., HARDY, W.D., JR., ESSEX, M. (1975). Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J Am Vet Med Assoc* **166**, 449-454.

DE GROOT, R. J., TER HAAR, R. J., HORZINEK, M. C., AND VAN DER ZEIJST, B. A. (1987). Intracellular RNAs of the feline infectious peritonitis coronavirus strain 79-1146. *J HORZINEKGen Virol***68 (Pt 4),** 995-1002

DECLERCQ, J., DE BOSSCHERE, H., SCHWARZKOPF, I., DECLERCQ, L. (2008). Papular cutaneous lesions in a cat associated with feline infectious peritonitis. *Vet Dermatol* **19**, 255-258.

DRAKER, R., ROPER, R. L., PETRIC, M., AND TELLIER, R. (2006). The complete sequence of the bovine torovirus genome. *Virus Res* **115**(1)**,** 56-68.

DYE, C., HELPS, C.R., SIDDELL, S.G. (2008). Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats. *J Feline Med Surg* **10**, 167-174.

DYE, C., SIDDELL, S.G. (2007). Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *J Feline Med Surg* **9**, 202-213.

EVERMANN, J. F., HEENEY, J. L., MCKEIRNAN, A. J., AND O'BRIEN, S. J. (1989). Comparative features of a coronavirus isolated from a cheetah with feline infectious peritonitis. *Virus Res* **13**(1), 15-27.

FOLEY, J.E., POLAND, A., CARLSON, J., PEDERSEN, N.C. (1997). Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J Am Vet Med Assoc* **210**, 1313-1318.

FRENKEL, M.J., WARD, C.W., SHUKLA, D.D. (1989). The Use of 3' Non-Coding Nucleotide-Sequences in the Taxonomy of Potyviruses - Application to Watermelon Mosaic Virus-2 and Soybean Mosaic Virus-N. *Journal of General Virology* **70**, 2775-2783.

GUT, M., LEUTENEGGER, C.M., HUDER, J.B., PEDERSEN, N.C., LUTZ, H. (1999). One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* **77**, 37-46.

HAIJEMA, B.J., VOLDERS, H., ROTTIER, P.J. (2003). Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome. *J Virol* **77**, 4528-4538.

HALSTEAD, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *J Infect Dis***140**(4)**,** 527-33.

HALSTEAD, S. B., LARSEN, K., KLIKS, S., PEIRIS, J. S., CARDOSA, J., AND PORTERFIELD, J. S. (1983). Comparison of P388D1 mouse macrophage cell line and human monocytes for assay of dengue-2 infection-enhancing antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **32**(1)**,** 157-63.

HARDY, W.D., JR. (1982). Immunopathology induced by the feline leukemia virus. *Springer Semin Immunopathol* **5**, 75-106.

HARTMANN, K. (2005). Feline infectious peritonitis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* **35**, 39-79, vi.

HERREWEGH, A. A., DE GROOT, R. J., CEPICA, A., EGBERINK, H. F., HORZINEK, M. C., AND ROTTIER, P. J. (1995). Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* **33**(3)**,** 684-9.

HERREWEGH, A. A., SMEENK, I., HORZİNEK, M. C., ROTTIER, P. J., AND DE GROOT, R. J. (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol* **72**(5)**,** 4508-14.

HERREWEGH, A.A., MAHLER, M., HEDRICH, H.J., HAAGMANS, B.L., EGBERINK, H.F., HORZINEK, M.C., ROTTIER, P.J., DE GROOT, R.J. (1997). Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. *Virology* **234**, 349-363.

HOHDATSU, T., IZUMIYA, Y., YOKOYAMA, Y., KIDA, K., AND KOYAMA, H. (1998). Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch Virol* **143**(5)**,** 839-50.

HOLLIDAY, T.A. (1971). Clinical aspects of some encephalopathies of domestic cats. *Vet Clin North Am* **1**, 367-378.

HOLZWORTH, J. (1963). Some important disorders of cats. *Cornell Vet* **53,** 157-60.

HORNYAK, A., BALINT, A., FARSANG, A., BALKA, G., HAKHVERDYAN, M., RASMUSSEN, T.B., BLOMBERG, J., BELAK, S. (2012). Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). *J Virol Methods* **181**(2), 155-163.

HSIEH, L. E., LIN, C. N., SU, B. L., JAN, T. R., CHEN, C. M., WANG, C. H., LIN, D. S., LIN, C. T., AND CHUEH, L. L. (2010). Synergistic antiviral effect of Galanthus nivalis agglutinin and nelfinavir against feline coronavirus. *Antiviral Res* **88**(1)**,** 25-30.

JUNGE, D., LIEBERMANN, H. (1990). Recent Developments in Virus Taxonomy. *Monatshefte Fur Veterinarmedizin* 45, 206-207.

KIPAR, A., KOHLER, K., LEUKERT, W., REINACHER, M. (2001). A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *J Comp Pathol* 125, 182-191.

KIPAR, A., MAY, H., MENGER, S., WEBER, M., LEUKERT, W., AND REINACHER, M. (2005). Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol***42**(3)**,** 321-30.

KOLB, A. F., HEGYI, A., MAILE, J., HEISTER, A., HAGEMANN, M., AND SIDDELL, S. G. (1998). Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol***440,** 61-7.

LAI, M.M., CAVANAGH, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution 48, 1-100.

LEUKERT W. (2002). Untersuchung der Wirksamkeit eines Impfstoffes gegen die Feline Infektiöse Peritonitis unter Tierheimbedingungen, Dissertation, Justus-Liebig-Universität.

LIN, C. N., SU, B. L., WANG, C. H., HSIEH, M. W., CHUEH, T. J., AND CHUEH, L. L. (2009). Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: a 5-year study in Taiwan. *Vet Microbiol* **136**(3-4)**,** 233-9.

LV, J., ZHANG, J., SUN, Z., LIU, W., AND YUAN, S. (2008). An infectious cDNA clone of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant associated with porcine high fever syndrome. *J Gen Virol* **89**(Pt 9)**,** 2075-9.

MARIONI-HENRY, K., VITE, C.H., NEWTON, A.L., VAN WINKLE, T.J. (2004). Prevalence of diseases of the spinal cord of cats. *J Vet Intern Med* **18**, 851-858.

MCARDLE, F., BENNETT, M., GASKELL, R. M., TENNANT, B., KELLY, D. F., AND GASKELL, C. J. (1992). Induction and enhancement of feline infectious peritonitis by canine coronavirus. *Am J Vet Res* **53**(9)**,** 1500-6.

MELI, M., KIPAR, A., MULLER, C., JENAL, K., GONCZI, E., BOREL, N., GUNN-MOORE, D., CHALMERS, S., LIN, F., REINACHER, M., AND LUTZ, H. (2004). High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *J Feline Med Surg* **6**(2)**,** 69-81.

MONTALI, R. J., STRANDBERG, J. D. (1972). Extraperitoneal lesions in feline infectious peritonitis. *Vet Pathol* **9**(2)**,** 109-21.

MOTOKAWA, K., HOHDATSU, T., AIZAWA, C., KOYAMA, H., AND HASHIMOTO, H. (1995). Molecular cloning and sequence determination of the peplomer protein gene of feline infectious peritonitis virus type I. *Arch Virol* **140**(3)**,** 469-80.

MOTOKAWA, K., HOHDATSU, T., HASHIMOTO, H., AND KOYAMA, H. (1996). Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol* **40**(6)**,** 425-33.

MURPHY, F. A. (1999). "Veterinary virology." 3rd ed. Academic Press, San Diego.

MURPHY, F.A., (1994). Virus Taxonomy - an Update. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **10**, R2-R3.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A., SUMMERS, M.D. (1995). Virus Taxonomy - 6th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, **1-&.**

NEGRIN, A., CHERUBINI, G.B., LAMB, C., BENIGNI, L., ADAMS, V., PLATT, S. (2010). Clinical signs, magnetic resonance imaging findings and outcome in 77 cats with vestibular disease: a retrospective study. *J Feline Med Surg* **12**, 291-299.

NORRIS, J.M., BOSWARD, K.L., WHİTE, J.D., BARAL, R.M., CATT, M.J., MALIK, R. (2005). Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). *Aust Vet J* **83**, 666-673.

OGUZOĞLU T.C., CAN SAHNA K., ATASEVEN V.S, MUZ D. (2010). Prevalence of feline coronavirus (FCoV) and feline leukemia virus (FeLV) in Turkish cats. *Ank. Üniv. Vet. Fak Derg*, **57,** 271-274.

PALTRINIERI, S., CAMMARATA, M.P., CAMMARATA, G., COMAZZI, S. (1998). Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occuring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopath*ol **65**, 205-220.

PEDERSEN, N. C. (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *J Feline Med Surg***11**(4)**,** 225-58.

PEDERSEN, N. C., BLACK, J. W., BOYLE, J. F., EVERMANN, J. F., MCKEIRNAN, A. J., AND OTT, R. L. (1984). Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol***173,** 365-80.

PEDERSEN, N. C., WARD, J., AND MENGELING, W. L. (1978). Antigenic relationship of the feline infections peritonitis virus to coronaviruses of other species. *Arch Virol***58**(1)**,** 45-53.

PEDERSEN, N.C. (1987). Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol* **218**, 529-550.

PEDERSEN, N.C., ALLEN, C.E., LYONS, L.A. (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *J Feline Med Surg* **10**, 529-541.

PEDERSEN, N.C., BLACK, J.W. (1983). Attempted immunization of cats against feline infectious peritonitis, using avirulent live virus or sublethal amounts of virulent virus. *Am J Vet Res* **44**, 229-234.

PEDERSEN, N.C., BOYLE, J.F., FLOYD, K. (1981a). Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am J Vet Res* **42**, 363-367.

PEDERSEN, N.C., BOYLE, J.F., FLOYD, K., FUDGE, A., BARKER, J., (1981b). An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res* **42**, 368-377.

PEDERSEN, N.C., THEILEN, G., KEANE, M.A., FAIRBANKS, L., MASON, T., ORSER, B., CHE, C.H., ALLISON, C. (1977). Studies of naturally transmitted feline leukemia virus infection. *Am J Vet Res* **38**, 1523-1531.

PRATELLI, A. (2008). Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *J Vet Diagn Invest* **20**, 45-50.

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1993). Immunology, 3rd ed. ed. Mosby.

ROTTIER, P. J. (1999). The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet Microbiol* **69**(1-2)**,** 117-25.

ROTTIER, P. J., NAKAMURA, K., SCHELLEN, P., VOLDERS, H., AND HAIJEMA, B. J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* **79**(22)**,** 14122-30.

ROTTIER, P.J., NAKAMURA, K., SCHELLEN, P., VOLDERS, H., HAIJEMA, B.J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* **79**, 14122-14130.

SAPATS, S. I., ASHTON, F., WRIGHT, P. J., AND IGNJATOVIC, J. (1996). Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus. *Virology* **226**(2)**,** 412-7.

SCHUTZE, H., ULFERTS, R., SCHELLE, B., BAYER, S., GRANZOW, H., HOFFMANN, B., METTENLEITER, T. C., AND ZIEBUHR, J. (2006). Characterization of White bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses. *J Virol* **80**(23)**,** 11598-609.

SHIBA, N., MAEDA, K., KATO, H., MOCHIZUKI, M., IWATA, H. (2007). Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary microbiology* **124**, 348-352.

SIDDELL, S., (1995). The coronaviridae. Plenum, New York ; London.

SIMONS, F. A., VENNEMA, H., ROFINA, J. E., POL, J. M., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J., AND EGBERINK, H. F. (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods* **124**(1-2)**,** 111-6.

SIMONS, F.A., VENNEMA, H., ROFINA, J.E., POL, J.M., HORZINEK, M.C., ROTTIER, P.J., EGBERINK, H.F. (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J Virol Methods* **124**, 111-116.

SITTIDILOKRATNA, N., HODGSON, R. A., COWLEY, J. A., JITRAPAKDEE, S., BOONSAENG, V., PANYIM, S., AND WALKER, P. J. (2002). Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis Aquat Organ* **50**(2)**,** 87-93.

SLAUSON, D.O., FINN, J.P. (1972). Meningoencephalitis and panophthalmitis in feline infectious peritonitis. *J Am Vet Med Assoc* **160**, 729-734.

SPARKES, A.H., GRUFFYDD-JONES, T.J., HARBOUR, D.A. (1991). Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. *The Veterinary record* **129**, 209-212.

STODDART, C. A., AND SCOTT, F. W. (1989). Intrinsic resistance of feline peritoneal macrophages to coronavirus infection correlates with in vivo virulence. *J Virol* **63**(1)**,** 436-40.

TAKANO, T., AZUMA, N., SATOH, M., TODA, A., HASHIDA, Y., SATOH, R., AND HOHDATSU, T. (2009). Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Arch Virol* **154**(5)**,** 775-81.

TAKANO, T., KATADA, Y., MORITOH, S., OGASAWARA, M., SATOH, K., SATOH, R., TANABE, M., AND HOHDATSU, T. (2008). Analysis of the mechanism of antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *J Gen Virol* **89**(Pt 4)**,** 1025-9.

TAKANO, T., OHYAMA, T., KOKUMOTO, A., SATOH, R., AND HOHDATSU, T. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP. *Virus Res* **158**(1-2)**,** 161-8.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

THIEL, V. (2007). "Coronaviruses : molecular and cellular biology." Caister Academic Press, Norfolk, UK.

THOR, S. W., HILT, D. A., KISSINGER, J. C., PATERSON, A. H., AND JACKWOOD, M. W. (2011). Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* **3**(9)**,** 1777-99.

TIMMANN, D., CIZINAUSKAS, S., TOMEK, A., DOHERR, M., VANDEVELDE, M., JAGGY, A. (2008). Retrospective analysis of seizures associated with feline infectious peritonitis in cats. *J Feline Med Surg* **10**, 9-15.

TRESNAN, D. B., LEVIS, R., AND HOLMES, K. V. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol* **70**(12)**,** 8669-74.

VAN HAMME, E., DEWERCHIN, H.L., CORNELISSEN, E., VERHASSELT, B., NAUWYNCK, H.J. (2008). Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on dynamin. *J Gen Virol* **89**, 2147-2156.

VENNEMA, H., POLAND, A., FOLEY, J., AND PEDERSEN, N. C. (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* **243**(1)**,** 150-7.

VOGEL, L., VAN DER LUBBEN, M., TE LINTELO, E. G., BEKKER, C. P., GEERTS, T., SCHUIJFF, L. S., GRINWIS, G. C., EGBERINK, H. F., AND ROTTIER, P. J. (2010). Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. *Vet Res* **41**(5)**,** 71.

WARD, J. M. (1970). Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology* **41**(1)**,** 191-4.

WEISS, R. C., AND SCOTT, F. W. (1981). Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis***4**(2)**,** 175-89.

WILLIAMS, G.D., CHANG, R.Y., BRIAN, D.A. (1999). A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. *J Virol* **73**, 8349-8355.

WOLFE, L. G., AND GRIESEMER, R. A. (1966). Feline infectious peritonitis. *Pathol Vet* **3**(3)**,** 255-70.

WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., HUANG, Y., YUEN, K.-Y. (2009). Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping*. Experimental Biology and Medicine* **234**, 1117-1127.

ZHANG, X., LIAO, C.L., LAI, M.M. (1994). Coronavirus leader RNA regulates and initiates subgenomic mRNA transcription both in trans and in cis. *J Virol* **68**, 4738-4746.

EK-1 Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nca verilmiş izin belgesi

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Genel Sekreterlik

Sayı : B.30.2.ANK.0.70.00.00/
Konu:

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Ankara

16/02/2011

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	:16/02/2011
TOPLANTI NO	:2011-105
DOSYA NO	:2011-341
KARAR NO	:2011-105-385

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Yılmaz Akça'nın araştırma yürütücüsü olduğu ve Vet.Hek.Hümay Akın'ın ortak çalışmaları olan "Türkiye'deki evcil kedilerde Feline Coronavirus epidemiyolojisi ve moleküler karakterizasyonu" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI (Başkan)	Mikrobiyoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Farmakoloji ABD.	Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Cahit ÜÇOK (Üye)	Ağız, Diş, Çene Cerrahisi ABD.	Diş Hekimliği Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji ABD.	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Ömer BEŞALTI (Üye)	Cerrahi ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme ABD.	Ziraat Fakültesi	E	
Doç.Dr.Meltem KOLOĞLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi ABD.	Tıp Fakültesi	K	
Doç.Dr.R.Tamay BAŞAĞAÇ GÜL (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)		Veteriner Hekimler Derneği	E	

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları

SAYI	TR NO	ÖRNEK ADI	YAŞ(AY)	CİNSİYET	IRK	SEMPTOM	EV/SOKAK	ÇOKLU/TEKLİ	AŞI
1	TR-FCOV- 001	İRMİK	19	D	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
2	TR-FCOV- 002	CEVİZ	11	D	SARMAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
3	TR-FCOV- 003	PÜSKÜL	9	E	SARMAN	İSHAL	EV	TEKLİ	VAR
4	TR-FCOV- 004	C-GÜMÜŞ	1	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
5	TR-FCOV- 005	C-TÜLAY	2	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
6	TR-FCOV- 006	C-PAMUK	1	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
7	TR-FCOV- 007	C-BONCUK	2	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
8	TR-FCOV- 008	C-GÜLLÜ	1	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
9	TR-FCOV- 009	C-PASAKLI	1	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
10	TR-FCOV- 010	ŞAHİN	12	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
11	TR-FCOV- 011	KANCA	9	D	TEKİR	ASCİTES	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
12	TR-FCOV- 012	PİNA	2	D	SARMAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
13	TR-FCOV- 013	TOPAÇ	40	D	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
14	TR-FCOV- 014	SIRMA	130	D	SARMAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
15	TR-FCOV- 015	ŞAPŞİ	18	E	SARMAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
16	TR-FCOV- 016	ITIR-FINDIK	8	D	SARMAN	LENFADENOPATİ	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
17	TR-FCOV- 017	BULUT	7	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
18	TR-FCOV- 018	İSTANBUL-1	15	D	İRAN	ASCİTES	EV	TEKLİ	VAR
19	TR-FCOV- 019	TAŞKIN	72	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
20	TR-FCOV- 020	ZEYNEP	60	E	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
21	TR-FCOV- 021	İSTANBUL-2	90	E	İRAN	LÖKOPENİ	SOKAK	TEKLİ	VAR
22	TR-FCOV- 022	HALİT	15	D	TEKİR	İYİLEŞMEYEN YARA	SOKAK	TEKLİ	YOK
23	TR-FCOV- 023	ZİLLİ	18	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

24	TR-FCOV- 024	SÜTLAÇ	18	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
25	TR-FCOV- 025	LEYLA	20	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
26	TR-FCOV- 026	MERLİN	9	E	SCOTTİSH FOLD	SAĞLIKLI	EV	BİLİNMİYOR	VAR
27	TR-FCOV- 027	EREN	10	E	TEKİR	İSHAL, BURUN AKINTISI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
28	TR-FCOV- 028	PIRPIR	10	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
29	TR-FCOV- 029	VET DORA	125	E	İRAN	İŞTAHSIZLIK, DEHİDRASYON	EV	ÇOKLU	VAR
30	TR-FCOV- 030	KARAMEL	3	E	SİYAM	İSHAL	EV	ÇOKLU	YOK
31	TR-FCOV- 031	ARSIZ	10	E	SİYAM	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
32	TR-FCOV- 032	BALA	9	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
33	TR-FCOV- 033	OTRAKÇI	8	E	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
34	TR-FCOV- 034	MANTAR	2	D	TEKİR	BÖLGESEL TÜY DÖKÜLMELERİ	SOKAK	ÇOKLU	YOK
35	TR-FCOV- 035	BAMBİ	18	D	TEKİR	KİLO ALAMAMA	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
36	TR-FCOV- 036	GRİ CÜCE	3	D	TEKİR	İSHAL	SOKAK	ÇOKLU	YOK
37	TR-FCOV- 037	MAŞUK	3	E	TEKİR	İSHAL	SOKAK	ÇOKLU	YOK
38	TR-FCOV- 038	AŞKIM	70	D	İRAN	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
39	TR-FCOV- 039	ZEYTİN MOR	19	E	SİYAH	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
40	TR-FCOV- 040	TEKİR	20	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
41	TR-FCOV- 041	TEKGÖZ	16	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
42	TR-FCOV- 042	ZORRO-2	9	D	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
43	TR-FCOV- 043	PEYNİR	12	D	ANKARA	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
44	TR-FCOV- 044	PEKMEZ	20	D	ANKARA	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
45	TR-FCOV- 045	ONYX	12	D	SİYAH	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
46	TR-FCOV- 046	HÜRREM	60	D	ANKARA	LENFOPENİ	SOKAK	ÇOKLU	YOK

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

47	TR-FCOV- 047	ANIL	65	E	ANKARA	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
48	TR-FCOV- 048	PULSAR	6	E	SARMAN	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
49	TR-FCOV- 049	ŞİLA	12	D	İRAN	PLEURİTİS	EV	TEKLİ	VAR
50	TR-FCOV- 050	PATİ	7	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
51	TR-FCOV- 051	HİRA	2	D	İRAN	İSHAL	EV	TEKLİ	VAR
52	TR-FCOV- 052	ONUR EREN	5	D	BSH	ASCİTES	EV	ÇOKLU	VAR
53	TR-FCOV- 053	BETÜL	36	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
54	TR-FCOV- 054	BİBER	15	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	YOK
55	TR-FCOV- 055	KİBRİT	10	E	SİYAM	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
56	TR-FCOV- 056	ŞULE	120	E	TEKİR	İŞEYEMEME	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
57	TR-FCOV- 057	AMANDA	90	D	SİYAM	GİNGİVİTİS	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
58	TR-FCOV- 058	MARİA	50	D	İRAN	HEPATİTİS	EV	TEKLİ	VAR
59	TR-FCOV- 059	GİNGER	2	E	TEKİR	TETRAPLEJİ TREMOR	SOKAK	ÇOKLU	YOK
60	TR-FCOV- 060	DOORJEE	11	E	TEKİR	İSHAL	EV	TEKLİ	VAR
61	TR-FCOV- 061	ÖZCAN	37	D	SİYAH	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
62	TR-FCOV- 062	CİMCİME	6	D	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
63	TR-FCOV- 063	BEYAZ	5	D	ANKARA	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
64	TR-FCOV- 064	GAMZE	5	E	İRAN	İSHAL	EV	TEKLİ	YOK
65	TR-FCOV- 065	TÜYTÜY	10	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
66	TR-FCOV- 066	ZİLLİ 2	75	D	İRAN	POLİÜRİ POLİDİPSİ	BİLİNMİYOR	BİLİNMİYOR	BİLİNMİYOR
67	TR-FCOV- 067	NEZİHA	60	D	SARMAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
68	TR-FCOV- 068	IŞIL	8	D	TEKİR	HALSİZ İSTAHSIZ	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
69	TR-FCOV- 069	SHİLA	13	E	SARMAN	ASCİTES	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
70	TR-FCOV- 070	POTUK	2	D	TEKİR	ÜSYE	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

71	TR-FCOV- 071	BATMAN	2	E	TEKİR	GÖZ BURUN AKINTISI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
72	TR-FCOV- 072	PÜSKÜL	3	E	TEKİR	HALSİZLİK DEHİDRASYON	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
73	TR-FCOV- 073	GÜNGÖR	3	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
74	TR-FCOV- 074	TOSKAR	25	D	SİYAH	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
75	TR-FCOV- 075	O.ÖZDEMİR	16	E	TEKİR	İSHAL	SOKAK	ÇOKLU	YOK
76	TR-FCOV- 076	MIRMIR	15	E	TEKİR	ÖKSÜRÜK	SOKAK	ÇOKLU	VAR
77	TR-FCOV- 077	YAVRU(VTM)	3	D	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
78	TR-FCOV- 078	KUKİ	2	D	SARMAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
79	TR-FCOV- 079	TORAMAN	60	E	İRAN	KORNEADA ULCUS	SOKAK	ÇOKLU	VAR
80	TR-FCOV- 080	BEBİŞ	4	E	TEKİR	GİNGİVİTİS	SOKAK	ÇOKLU	YOK
81	TR-FCOV- 081	MAYIS FARUK	60	D	TEKİR	ASCİTES HEPATİTİS	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
82	TR-FCOV- 082	ŞANS	18	D	İRAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
83	TR-FCOV- 083	PETCİTY	10	D	TEKİR	ASCİTES	SOKAK	ÇOKLU	YOK
84	TR-FCOV- 084	BÜLENT	60	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	TEKLİ	VAR
85	TR-FCOV- 085	YASEMENT	7	D	İRAN	ÜSYE İSHAL	SOKAK	TEKLİ	VAR
86	TR-FCOV- 086	DUDU	4	D	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
87	TR-FCOV- 087	POFUR	4	E	TEKİR	İSHAL	SOKAK	ÇOKLU	YOK
88	TR-FCOV- 088	YODA	18	E	İRAN	İKTERUS	EV	TEKLİ	VAR
89	TR-FCOV- 089	HAVUÇ	3	D	SARMAN	İSHAL	SOKAK	ÇOKLU	YOK
90	TR-FCOV- 090	ZİGGY	8	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
91	TR-FCOV- 091	ESEN	15	E	SARMAN	KANLI DIŞKI KUSMA HALSİZLİK	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
92	TR-FCOV- 092	AYŞE	6	D	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

93	TR-FCOV- 093	BONZO	4	E	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
94	TR-FCOV- 094	MUCİZE	72	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
95	TR-FCOV- 095	ELF	72	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
96	TR-FCOV- 096	GİZEM	2	E	ANKARA	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
97	TR-FCOV- 097	BÜSO	78	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
98	TR-FCOV- 098	RAGIP	48	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
99	TR-FCOV- 099	KARAKAŞ	120	D	TEKİR	ASCİTES	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
100	TR-FCOV- 100	DUMAN	30	E	İRAN	LENFOPENİ NÖTROFİLİ İKTERUS	EV	TEKLİ	VAR
101	TR-FCOV- 101	ESRA(ELİF-PALSİ)	5	E	TEKİR	İNKOORDİNASYON	SOKAK	ÇOKLU	YOK
102	TR-FCOV- 102	EFE	125	E	SARMAN	LENFOPENİ	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
103	TR-FCOV- 103	BICIK	28	E	TEKİR	İŞEYEMEME	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
104	TR-FCOV- 104	TARÇIN	7	D	SARMAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
105	TR-FCOV- 105	BUCAK	12	D	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
106	TR-FCOV- 106	N. YAMAN	6	E	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
107	TR-FCOV- 107	PAREL	6	E	TEKİR	OTİTİS	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
108	TR-FCOV- 108	P.UĞUR	5	D	TEKİR	ASCİTES	SOKAK	ÇOKLU	YOK
109	TR-FCOV- 109	MİYAV	9	E	VAN	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
110	TR-FCOV- 110	AYFER ERGÜN	10	E	TEKİR	ASCİTES	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
111	TR-FCOV- 111	ÖĞRENCİ	5	D	TEKİR	İNKOORDİNASYON	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
112	TR-FCOV- 112	BAMBAM	18	E	VAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	YOK
113	TR-FCOV- 113	FELİS	15	E	TEKİR	LENFADENOPATİ	SOKAK	ÇOKLU	VAR
114	TR-FCOV- 114	GARFİELD	30	E	SARMAN	UYUZ	SOKAK	ÇOKLU	YOK
115	TR-FCOV- 115	CİHAN	16	E	TEKİR	ASCİTES	SOKAK	ÇOKLU	YOK

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

116	TR-FCOV- 116	KÖMÜR	15	E	SİYAH	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
117	TR-FCOV- 117	MENEKŞE	18	D	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
118	TR-FCOV- 118	MIRIL	36	E	SİYAH	HORNER SND.	EV	ÇOKLU	VAR
119	TR-FCOV- 119	MINCIR	14	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
120	TR-FCOV- 120	KIRÇIL	14	D	TEKİR	İSHAL	EV	ÇOKLU	VAR
121	TR-FCOV- 121	GIY	24	D	TEKİR	ASCİTES	SOKAK	TEKLİ	VAR
122	TR-FCOV- 122	KOPUK	6	E	TEKİR	SAĞLIKLI	SOKAK	ÇOKLU	YOK
123	TR-FCOV- 123	NURTOP	150	D	SİYAM	DERİ DÖKÜNTÜLERİ	SOKAK	TEKLİ	VAR
124	TR-FCOV- 124	KARA	11	E	TEKİR	GÖZ AKINTISI	SOKAK	ÇOKLU	VAR
125	TR-FCOV- 125	YULAF	10	E	SCOTTİSH FOLD	ASCİTES	EV	TEKLİ	VAR
126	TR-FCOV- 126	TIRSIK	30	E	SARMAN	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
127	TR-FCOV- 127	GOŞA	8	D	TEKİR	ASCİTES	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
128	TR-FCOV- 128	AMY	5	D	BSH	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
129	TR-FCOV- 129	GEORGE	10	E	BSH	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
130	TR-FCOV- 130	ASLI ATAÇ	8	E	TEKİR	KÖRLÜK	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
131	TR-FCOV- 131	ÜLKER ERKUL	120	D	TEKİR	HORNER	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
132	TR-FCOV- 132	SİMSİM	10	D	SİYAM	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
133	TR-FCOV- 133	TOM	30	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
134	TR-FCOV- 134	ÇAPKIN	5	E	SCOTTİSH FOLD	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
135	TR-FCOV- 135	SUZİE	6	D	İRAN	BÜYÜME GERİLİĞİ	EV	ÇOKLU	VAR
136	TR-FCOV- 136	PLEJİK	5	E	TEKİR	İNKOORDİNASYON	SOKAK	ÇOKLU	YOK
137	TR-FCOV- 137	PAMUK	76	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
138	TR-FCOV- 138	NAZ	75	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR

Ek 2. Örneklenen Hayvanların Yaş, Irk, Cinsiyet, Sağlık Durumları, Tekli/Çoklu Yaşam Koşulları Ve Aşı Durumları (devam)

139	TR-FCOV- 139	ARAP	76	D	SİYAM	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
140	TR-FCOV- 140	MİÇO	72	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
141	TR-FCOV- 141	PRENS	72	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
142	TR-FCOV- 142	BONCUK	132	D	TEKİR	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
143	TR-FCOV- 143	DUMAN (AYDIN)	10	E	TEKİR	ZAYIFLAMA, YÜKSEK ATEŞ	EV	TEKLİ	VAR
144	TR-FCOV- 144	KÖKER	11	E	SİYAM	SAĞLIKLI	EV	ÇOKLU	VAR
145	TR-FCOV- 145	CALYPSO	2	E	TEKİR	SAĞLIKLI	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
146	TR-FCOV- 146	SİMBA	30	E	VAN	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	VAR
147	TR-FCOV- 147	GÜMÜŞ-VTM	9	D	İRAN	İSHAL	EV-ADOPTED	TEKLİ	VAR
148	TR-FCOV- 148	FULYA	16	E	BSH	İSHAL	EV	TEKLİ	VAR
149	TR-FCOV- 149	SEZAR	15	E	İRAN	SAĞLIKLI	EV	TEKLİ	VAR
150	TR-FCOV- 150	ATEŞ	5	D	İRAN	ASCİTES	EV	TEKLİ	VAR
151	TR-FCOV- 151	YUMAK	9	E	TEKİR	İSHAL	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK
152	TR-FCOV- 152	MİSKET	7	D	TEKİR	ASEMPTOMATİK	EV-ADOPTED	ÇOKLU	YOK

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri

>Bulent-kan
TGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATT
TAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGC

>Bulent-rs
CGCGGTCTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTGATAGGAGGTA
CAAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCT
AGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAA
TGGAAGAGC

>Esen-kan
TGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTGATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATT
TAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACAATGGA
AGAGC

>Esen-rs
GCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTGATAGGAGGTAC
AAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTA
GATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAAT
GGAAGAGCAAA

>Garfield-kan
CTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAGTAGGAGGTACAAGCAACCCT
ATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTACT
TTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGCAA
CG

>Garfield-rs
CTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCT
ATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAAT
TTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Halit-kan
GCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT
AGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAA
GAGC

>Halit-rs
TGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATT
TAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGCTAACGTCTGGATCTA

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri (devam)

>Karakas-kan
CTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCT
ATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGTTAGATTTAGTAAT
TTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Karakas-rs
GTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGTTAGATTTA
GTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACAATGGAAG
AGC

>Kircil-kan
GCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAA
GCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGA
TTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGG
AAGAGC

>Kircil-rs
ATCACGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGG
TACAAGCAACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATG
CTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAAC
AATGGAAGAGCTAACGTCTGGATCTAGTG

>Kuki-kan
GTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT
AGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAA
GAGC

>Kuki-rs
CTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAG
CAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGAT
TTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGCTAACGTCTGGATCT

>Mincir-kan
GCCTACTCTTGTACATAATGTTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACGAGCA
ACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAACGCTAGATTT
AGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAA
GAGC

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri (devam)

>Mincir-rs
CCTACTCTCTTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAA
CCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTA
GTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAG
AGCTAACGTCTGGATCTAGTGAGCGATGACCCGTAATTCCTCGGAAAGA
CCAGCTTTAAACATCGGGTTGCC

>Miril-kan
CGCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTA
CAAGCAACCCTGTTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCT
AGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAA
TGGAAGAGC

>Miril-rs
CGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACA
AGCAACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAG
ATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATG
GAAGAGC

>Nurtop-kan
CTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAG
CAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGAT
TTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGC

>Nurtop-rs
ACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCC
TATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAA
TTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Pati-kan
GGCAACCCGATGTTTAAAACTAGTCTTTTCCGAGGAATTACTGGTCATC
GCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTAC
AAGCAACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTA
GATTTAGTAACTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTA

>Pati-rs
CAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTGCATA
TTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGA
AGTTTAAAGATCCGCTAC

>Prens-kan
GCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTA
GTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAG
AGC

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri (devam)

>Prens-rs
GCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTA
GTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAG
AGC

>Arsiz-rs
GCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAA
GCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGA
TTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGG
AAGAGCAAACGTCTGGATCTAGTGATCACCCGATGGTT

>Ates-kan
CGACAACCCGATGTTTAAAACTGGTTTTTCCGAGGAATTACTGGTCATC
GCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTAC
AAGCAACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTA
GATTTAGTAATTTAGAGAAGTT

>Bala-kan
ATGACGGCTCATAGCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTG
TAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGA
TTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGGAGTTTAAAGATCCGCTATG
ACGAGCCAACAATGGAAGAGCTAACGT

>Biber-rs
CCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTTTACTTTTGTACAGAATGGTAA
GCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTT
AGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAA

>Dudu-rs
GCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCA
ACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTT
AGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAA
GAGCTAACGTC

>Elf-kan
CTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTAT
TGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGTTAGATTTAGTAATTT
AGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Gumus-rs
TTTCCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGG
TAAGCACGTGTAATGGGAGGTACAAGCAACCCTATTACATATTAGGAAG
TTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAG
ATCC

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri (devam)

>Hira-kan
CCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAA
GCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTGCATAGTAGGAAGTTT
AGACTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAATGATTTAGA

>Itir-kan
TTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATT
GCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTA
GAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Karamel-kan
TACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTACA
TATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAGTGCTAGATTTAGTAATTTAGA
GAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

>Kibrit-kan
CCGAGGAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAA
GCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCCTATTACATATTAGGAAGTTT
AGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGAT
CC

>Maria-kan
ATGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAG
CAACCCTATTACATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGAT
TTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGC

>Menekse-kan
GAATTACTGGTCATCGCGCTGTCTACTCTTGTCCAGAATGATAAGCACG
TGTAAGAGGAGGTAGAAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTT
GATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTA
TGACGAGCCAACAATGGAAGAGCAAACG

>Otrakci-kan
TGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGAGTTGGCAGTGCTAGATT
TAGTAATTTAGAGAAGGTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGC

>Petc-rs
TGTCTACTCTTGGTAAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGTTAGATTT
AGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTACGACGAGCCAACAATGGAA
GAGCAAAC

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri (devam)

>Pina-kan
GCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTAC
AAGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGAtttgGCAATGCTAGA
TTTAGTATTCTCGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATG
GAGGAGCTAACGTCTGGATCTAGTGA

>Sirma-rs
CCGAGGAATCACTGGTCAGCGCCCTGTGTTCTCTTGCACAGAAGGGTA
AGCACGTGCAATAGGAGGTACAAGCTACCCTATTGCATATTAGGAAGTT
TAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATTTAGTAATTTAGAGAAGT

>Taskin-kan
CGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACA
AGCAACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAG
ATTTAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATG
GAAGAGC

>Ziggy-rs
TGTCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGC
AACCCTATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCAATGCTAGATT
TAGTAATTTAGAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGA
AGAGCAAACGTCTGGATCTAGTGA

>Zilli-kan
ACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTACAAGCAACCC
TATTGCATATTAGGAAGTTTAGATTTGATTTGGCGATGCTAGATTTAGTA
ATTCACAGAAGTTTAAAGATCCGCTATGACGAGCCAACAATGGAAGAGC

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Hümay

Soyadı : AKIN

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 03/11/1982

Uyruğu : T.C

Medeni Durumu : Evli

İletişim Adresi : Hititpark Sukent Sitesi, B Blok No:14

E-posta : humayakin1982@gmail.com

GSM : +90 555 4147527

II. Eğitimi

Lisansüstü : Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Lisans : Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara

Yabancı Diller : İngilizce

III. Üye Olduğu Bilimsel Kuruşlar

- Türk Mikrobiyoloji Derneği

IV. Bilimsel İlgi Alanları

Kedi hastalıkları, Coronaviridae

Yayınları

1. MUZ D, OĞUZOĞLU TC, TİMURKAN MO, **AKIN H.,** Characterization of the partial VP2 gene region of canine parvoviruses in domestic cats from Turkey. Virus Genes, Apr;44(2):301-8 (2012).

2. MAHZOUNIEH, M., DINCER, E., FARAJI, A.R., **AKIN, H**., AKKUTAY, A.Z., OZKUL, A., Relationship Between Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Strain Circulating in Iran and Turkey: Possibilities for transborder transmission. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 12(9), 2012 Aug 27 (2012).

Bildirileri

1. AKIN, H., AKÇA Y., OĞUZOGLU T.C., Türkiye'de evcil kedilerde feline coronavirus enfeksiyonlarının moleküler karakterizasyonu, FECAVA, İstanbul- Turkey, 7-10 September, 2011.

Projeler

1. Yerel Mavidil virusu izolatlarının Plak Redüksiyon Nötralizasyon (PRN) ve Reverz Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) teknikleri ile serotipik identifikasyonu, A.Ü BAP 2008-2009 (Yardımcı Personel).

2. Çukurova bölgesinde Batı Nil Virus (BNV) enfeksiyonunun etiyolojik ve serolojik olarak araştırılması ve vektör özelliklerinin belirlenmesi. Tübitak Araştırma Projesi, Proje No: 110S404, 2011-2013, (Yardımcı Araştırmacı).

İş Deneyimleri

1. Halen-2011: Mor Pati Veteriner Kliniği, Çayyolu, Ankara; Veteriner Hekim

2. 2011-2009: Gordion Diagnostik Ltd. Şti., Polatlı, Ankara; Hücre Kültürü Departman Sorumlusu, Ar-Ge Personeli