

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KUZEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE  
ORTAYA ÇIKAN KOYUN VE KEÇİ ÇİÇEĞİ  
OLGULARININ SEROLOJİK, VİROLOJİK VE  
EPİZOOTİYOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İbrahim SÖZDUTMAZ**

**ELAZIĞ – 2010**

## ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Prof. Dr. Emine ÜNSALDI**

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Veteriner Fakültesi Viroloji

Anabilim Dalı Başkanı



**Prof. Dr. Yusuf BOLAT**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Prof. Dr. Hakan BULUT** (Danışman)

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

**Prof. Dr. Yusuf BOLAT**



**Prof. Dr. Hakan BULUT**



**Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ**



**Doç. Dr. Orhan YAPICI**



**Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR**



## İTHAF

*Bu tezi eşime ve oğullarıma ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hakan BULUT'a, Fırat Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. Yusuf BOLAT'a, desteklerinden dolayı Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürü Uzman Veteriner Hekim Ufuk DİNLER'e, saha ve laboratuvar çalışmalarımın yardımcı olan mesai arkadaşım Veteriner Hekim Ömer Faruk KÜÇÜKKALEM'e ve geçmiş yıllarda Türkiye'de elde edilmiş koyun ve keçi izolatlarını çalışmamda kullanmama imkan sağlayan Dr. Veli GÜLYAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme bana bu güne kadar verdikleri manevi ve maddi tüm desteklerden dolayı, eşime doktora dönemim süresince gösterdiği sabır ve desteği için teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmaya sağlamış oldukları maddi destekten dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP-1531 nolu proje)'ne ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM-HS /09/06/02/147 nolu proje)'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI .....	i
ONAY SAYFASI .....	ii
İTHAF .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ .....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Etiyoloji .....	6
3.2. Tarihçe.....	9
3.3. Epizootiyoloji .....	10
3.4. Virüs Replikasyonu .....	13
3.5. Klinik Belirtiler .....	14
3.6. Patogenez.....	17
3.7. Nekropsi Bulguları .....	18
3.8. Teşhis.....	19
3.9. Virüslerin Üretildiği in-vitro ve in-vivo Sistemler .....	22

3.10. Capripoxvirusların Tiplendirilme Teknikleri .....	24
3.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	24
3.10.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	25
3.10.3. PZR-RFLP .....	25
3.10.4. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing) .....	26
3.11. Koruma ve Kontrol.....	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4.1. Hücre Kültürü.....	33
4.2. Virüs .....	33
4.3. Fötal Dana Serumı .....	34
4.4. Örneklerin Toplanması.....	34
4.5. Serum Örneklerinin Hazırlanması.....	35
4.6. Doku ve Svap Örneklerinin İşlenmesi.....	35
4.7. Doku Örneklerinden Virüs İzolasyonu.....	36
4.8. Hiperimmün Serum Elde Edilmesi.....	37
4.9. Kontrol Virüsün Üretimi ve Virüs Titrasyonu .....	37
4.10. Nötralizasyon İndeksinin Belirlenmesi .....	39
4.11. PZR.....	39
4.11.1. DNA Ekstraksiyonu .....	39
4.11.2. DNA Miktarının Belirlenmesi.....	40
4.11.3. Virüs Teşhisine Yönelik PZR.....	41

4.11.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi .....	42
4.12. Restriksiyon Enzim Kesimi .....	43
4.12.1. PZR Ürününün Pürifikasyonu .....	43
4.12.2. Kesim Aşaması .....	44
4.13. Filogenetik Analiz İçin Uygun Gen Bölgelerinin Seçimi ve PZR .....	48
4.14. Dizileme .....	49
5. BULGULAR .....	50
5.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları .....	50
5.2. PZR Sonuçları .....	53
5.3. PZR-RFLP Analizi .....	55
5.4. Virüs İzolasyonu .....	56
5.5. Nötralizasyon İndeksi .....	57
5.6. Filogenetik Analiz Amacıyla Gerçekleştirilen PZR .....	58
5.7. DNA Dizileme Sonuçları .....	58
6. TARTIŞMA .....	62
7. KAYNAKLAR .....	70
8. ÖZGEÇMİŞ .....	79

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Çalışma kapsamında değerlendirilmek üzere temin edilen virüsler. ....	33
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan örneklerin elde edildiği numunelere ait bilgiler.	35
<b>Tablo 3.</b> PZR karışımının içeriği. ....	42
<b>Tablo 4.</b> PZR’de kullanılan primerler ve beklenen ürün büyüklüğü. ....	42
<b>Tablo 5.</b> Filogenetik inceleme için kullanılan primer dizilimleri. ....	48
<b>Tablo 6.</b> PZR karışımının içeriği. ....	49
<b>Tablo 7.</b> Mihraklardaki hayvan sayıları ve hastalıktan etkilenenlerin dağılımı. ....	51
<b>Tablo 8.</b> Mihraklara ait klinik ve nekropsi bulguları. ....	52
<b>Tablo 9.</b> Organ ve dokulardan elde edilen PZR sonuçları. ....	54
<b>Tablo 10.</b> Materyal türüne göre PZR pozitiflik sayıları ve oranları. ....	55
<b>Tablo 11.</b> İzolatlar ve referans virüse ait titre değerleri. ....	56
<b>Tablo 12.</b> ClustalW genetik analiz programı kullanılarak yapılan çoklu hizalama tablosu. ....	60

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Capripoxvirüslere ait hücre içi zarfsız virüs (intracellular mature virus; IMV) ve hücre dışı zarflı virüs (extracellular enveloped virus; EEV) görünümü .....	7
<b>Şekil 2.</b> Koyun-keçi çiçeği hastalığının Dünya'daki mevcut durumu. ....	13
<b>Şekil 3.</b> <i>XapI (Apo I)</i> Enzimi restriksiyon tanıma bölgesi. ....	44
<b>Şekil 4.</b> Koyun çiçeği virüsleri ITRs gen bölgesi için enzim kesim haritası. ....	46
<b>Şekil 5.</b> Keçi çiçeği virüsleri ITRs gen bölgesi için enzim kesim haritası. ....	47
<b>Şekil 6.</b> PZR ürünlerinin etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü. ....	53
<b>Şekil 7.</b> PZR-RFLP Analiz sonuçları.....	55
<b>Şekil 8.</b> Filogenetik dizileme için elde edilen PZR ürünlerinin görünümü. ....	58
<b>Şekil 9.</b> Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı. ....	61

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AGID</b>	: Agar gel immunodifusion
<b>AGIPT</b>	: Agar gel immunoprecipitation test
<b>BHK21</b>	: Baby hamster kidney
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b>CAEV</b>	: Cell associated enveloped virus
<b>CIEP</b>	: Counter immuno electrophoresis
<b>CPE</b>	: Sitopatolojik etki
<b>DIFA</b>	: Direct immuno florescen Assay
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's minimal essential medium
<b>dak</b>	: Dakika
<b>DKID<sub>50</sub></b>	: Doku kültürü enfektif doz 50
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetraasetik asit
<b>EEV</b>	: Extracellular enveloped virus
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked immuno sorbent assay
<b>FDS</b>	: Fötal dana serumu
<b>GTPV</b>	: Keçi çiçeği virüsü
<b>HE</b>	: Hemotoksilen-Eosin
<b>IMV</b>	: Intracellular mature virus
<b>ITR's</b>	: Inverted terminal repeat sequences
<b>kbp</b>	: Kilobaz çifti

<b>LSDV</b>	: Lumpy skin disease virus
<b>MDBK</b>	: Madin-darby bovine kidney
<b>M</b>	: Molar
<b>Mda</b>	: Moleküler dalton
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>PBS</b>	: Phosphate buffered saline
<b>pH</b>	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
<b>PVKAE</b>	: Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment length polymorphism
<b>SPPV</b>	: Koyun çiçeği virüsü
<b>TAE</b>	: Tris asetik asit EDTA
<b>OIE</b>	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
<b>Vero</b>	: Afrika yeşil maymun böbrek hücresi
<b>VNT</b>	: Virüs nötralizasyon testi

## 1. ÖZET

Koyun-keçi çiçeği hastalığı ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyada, salgınlar şeklinde ortaya çıkan küçük ruminantların viral hastalığıdır.

Bu tezde Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde ortaya çıkan koyun-keçi çiçeği hastalığı olgularının virolojik, serolojik ve epizootiyolojik yönden incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle, bölgede klinik olarak koyun-keçi çiçeği hastalığı bildirimi yapılmış 11 mihraktaki 53 hayvandan temin edilen 168 adet materyallerden PZR ile koyun-keçi çiçeği virüs DNA'sı belirlenmiştir. Viral DNA varlığı belirlenen materyallerden her bir mihrak ayrı ayrı olmak üzere MDBK hücre hattına inokulasyonlar yapılarak virüs izole edilmiştir. Ayrıca mihraklarda klinik belirti gösteren 22 hayvandan ve klinik belirti göstermeyen 10 hayvandan alınan kan serumlarında nötralizan antikor titreleri belirlenmiştir. İzole edilen virüslerin genotipik kimliklendirilmesi ile koyun çiçeği virüsü (SPPV) ve keçi çiçeği virüsü (GTPV) ayrımları yapılmıştır.

PZR sonuçlarına göre; deri örneklerinin % 96,2 (51/53)'sinde, nazal ve oral svap örneklerinin % 76,9 (40/52)'unda, akciğer örneklerinin % 90,4 (19/21)'ünde, karaciğer örneklerinin % 42,8 (9/21)'inde ve lenf yumrusu örneklerinin % 61,9 (13/21)'unda koyun-keçi çiçeği virüs DNA'sı tespit edilmiştir.

Virüs nötralizasyon testi sonucunda, klinik hastalık görülen tüm hayvanlarda ve klinik hastalık görülmeyen dört hayvanda koruyucu titrenin altında antikor titresi tespit edilmiştir. Diğer hayvanlarda antikor titresi korucu titrenin üzerinde bulunmuştur.

Mihraklardan elde edilen izolatların PZR ürünlerinin *XapI* restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiş ve tamamının SPPV oldukları belirlenmiştir.

Capripoxvirusların ayırımını sağlayacak genomun terminal kısımlarının DNA dizilim analizi sonucunda da restriksiyon enzim kesim sonuçları doğrulanmıştır.

Bulgular ışığında ÷lkemizde k÷çukbaş hayvan yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı Kuzeydoğu Anadolu b÷lgesinde bu hastalığın mevsimsel olarak ve gen÷ hayvanlarda yoğun olarak gör÷ld÷đü belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmanın yapıldığı d÷nemde koyun ve keçilerde hastalığa sebep olan vir÷s÷n SPPV olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun-keçi çiçeği hastalığı, PZR, PZR- RFLP, vir÷s izolasyonu, DNA dizileme.

## 2. ABSTRACT

Sheep and goat pox disease is viral disease of small ruminants which is characterised with outbreaks in wide geographical region including Turkey.

It is aimed to investigate sheep and goat pox disease in Northeast Anatolian region of Turkey by virological, serological and epizootiological methods. For this purpose, sheep pox virus (SPPV) and goatpox virus (GTPV) DNAs were detected by PCR in 168 clinical specimens taken from 53 animals in 11 disease outbreaks. Virus isolations were performed in Madin-darby bovine kidney (MDBK) cell culture for each outbreak. Beyond these, virus neutralisation titres of serum samples collected from 22 animals with clinical disease symptoms and 10 animals without any clinical symptoms from the outbreaks were determined. SPPV and GTPV differentiations were detected by PCR-RFLP and DNA sequencing methods.

Results of PCR analysis indicated that, sheep and goat pox virus DNAs were detected in 96,2 % (51/53), 76,9 % (40/52), 90,4 % (19/21), 42,8 % (9/21) and 61,9 % (13/21) of cutaneous, nasal and oral swap specimens, lung, liver tissue samples and lymph nodules, respectively.

Virus neutralisation titres were found below the accepted-protective levels in all animals with clinical disease symptoms and in four animals without clinical symptoms. In the other animals, virus neutralisation titres were found above the accepted-protective levels.

All of the isolated virus samples from the outbreaks were determined as SPPV by PCR-RFLP method. This finding was further confirmed by sequence analysis of terminal region of the virus genome.

In the light of the findings of the present study, it can be concluded that sheep and goat pox disease cases occur seasonally, especially in young animals, in Northeast Anatolian region. More importantly, the viruses isolated within the study period had SPPV genome characteristics, as determined by PCR-RFLP and sequencing.

**Key words:** Sheep-goat pox disease, PCR, PCR-RFLP, virus isolation, DNA sequencing.

### 3. GİRİŞ

Koyun-keçi çiçeği hastalığı ile ilgili tarihsel bilgiler insan çiçeği hastalığı kadar eskidir (80, 126). Koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yapıldığı dünyanın hemen her bölgesinde hastalığın geçmiş yıllardaki varlığı bilinmekte ve hastalık klinik belirtilerine göre tanımlanabilmektedir. Günümüzde Avrupa ülkelerinde hastalık eradike edilmiş olmasına rağmen, ülkemizin de içinde yer aldığı pek çok Asya ve Afrika ülkelerinde hastalık varlığını sürdürmektedir (37, 57, 60, 108, 109, 124, 135, 136, 137, 138, 139). Hastalık dünyada ve ülkemizde, özellikle düzenli aşılanmanın yapılmadığı ve hayvan hareketlerinin yoğun olduğu bölgelerde, çoğunlukla genç hayvanlarda yüksek ölüm oranı ile kendini gösteren mevsimsel salgınlar şeklinde ortaya çıkmaktadır (64, 102, 112, 117, 124, 133).

Koyun-keçi çiçeği hastalığı birçok ülkede ihbarı mecburi bir hastalıktır ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) kriterlerine göre de mücadelede öncelikli hastalıklar olarak değerlendirilen A grubu hastalıklar arasında yer almaktadır. Dünya Ticaret Örgütü'nün hayvan sağlığı konularında birincil tavsiye makamı da olan OIE direktiflerine göre hastalığın görüldüğü ülkeden uluslararası canlı hayvan, et ve et ürünleri ile diğer hayvansal ürünlerin ticaretinde önemli kısıtlamalar getirilmektedir. Bu kriterler dikkate alındığı zaman, hastalığın ekonomik kayıplarının sadece hastalığa bağlı verim kayıpları ve ölümlerle sınırlı olmadığı, bir ülkenin ihracatını da etkilediği görülebilmektedir (12).

Koyun-keçi çiçeği hastalığı, ülkemizde hayvan sağlığı zabıtası yönetmeliği ile ihbarı mecburi hayvan hastalıkları kapsamında yer almaktadır. Hastalığın klinik olarak tespit edildiği ilk günden başlayarak, son olarak görüldüğü günden

60 gün sonrasına kadar hastalık çıkan bölgelerden hayvan ve hayvansal ürünlerin çıkışına ve diğer bölgelerden hastalık çıkış bölgesine hayvan girişlerine kısıtlamalar getirilmektedir (16).

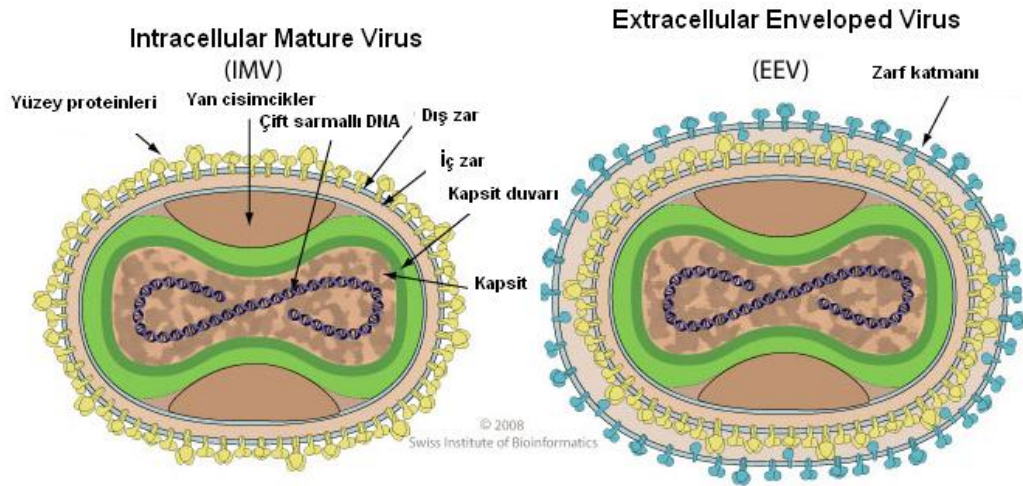
Koyun-keçi çiçeği hastalığının endemik olarak görüldüğü ülkemizde hastalık bildirimleri genellikle klinik belirtilerine dayanılarak yapılmaktadır. Bu bildirimlerin sadece çok az bir kısmının ulusal referans enstitüleri tarafından laboratuvar doğrulması yapılmakta ve bu nedenle ortaya çıkan olgular hakkında bilgiler yeterince ortaya konarak değerlendirilememektedir. Koyun ve keçi yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bir bölge olan Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde aşılamalara rağmen hastalık görüldüğü bildirilmiştir. Coğrafik konumu nedeniyle de, kaçak hayvan girişlerinin olması muhtemel bir bölgedir. Kaçak hayvan girişlerinin mümkün olduğu İran gibi komşu ülkelerde koyun-keçi çiçeği hastalığının yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tezde Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde ortaya çıkan koyun-keçi çiçeği hastalığı olgularının virolojik, serolojik ve moleküler epizootiyolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

### **3.1. Etiyoloji**

*Poxviridae* ailesinin *Chordopoxvirinae* alt ailesinde bulunan sekiz türden biri olan capripoxvirus genusunda koyun çiçeği virüsü (Sheeppox virus; SPPV), keçi çiçeği virüsü (Goatpox virus; GTPV) ve sığırların kabarcıklı deri hastalığı virüsü (Lumpy skin disease virus; LSDV) yer almaktadır (44, 45, 57). Elektron mikroskobu çalışmalarında bu virüsler arasında büyüklüklerine göre ayırım yapılabileceği belirtilmişse de sonraki zamanlarda gerçekleştirilen benzer

çalışmalarda arada gözlenen bu farklılığın morfolojik olarak bozulamdan kaynaklandığı ve capripoxvirus genusu içerinde yer alan virüsler arasında büyüklük açısından bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir (3, 88, 110). Bu nedenle, bu virüslerin elektron mikroskopla ayrımlarının doğru bir şekilde yapılamayacağı kabul görmüştür. Capripoxvirus virionları yaklaşık 300X270X200 nm büyüklüğünde oval yapıda olup orthopoxvirus genusunda içinde bulunan diğer virüslerle benzerlik göstermektedir (şekil 1) (128).

Enfekte olan hücrelerde iek virüsleri hücre içi zarfsız virüs (intracellular mature virus; IMV) ve hücre dışı zarflı virüs (extracellular enveloped virus; EEV) olmak üzere iki farklı şekilde virüs üremektedir. İki virüs arasındaki fark IMV’de pek çok virüs proteinini içeren zarf katmanının olmamasıdır. Hücre dışı zarflı virüs, hücre içi ergin virüsün plazma membranından tomurcuklanması veya ekzositozu yoluyla oluşur (128).



**şekil 1.** Capripoxviruslara ait hücre içi zarfsız virüs (intracellular mature virus; IMV) ve hücre dışı zarflı virüs (extracellular enveloped virus; EEV) görünümü (20).

Bu virüslerde tam genom 150-160 kilobaz çifti (kbp) uzunluğunda, 73-91 moleküler dalton (Mda) ağırlığında olup, %36 oranında guanin+sitozin içeren doğrusal, çift sarmallı deoksiribonükleik asit (DNA)'ya sahiptir. Genomun az değişken olan merkezi bölgesi, yaklaşık 145 kbp uzunluğunda olup, her iki terminal kısımda yer alan tersine tekrarlayan sekanslar (Inverted terminal repeat sequences; ITR's) şeklinde birbiri ardına gelen tekrarlı bölgelere sahiptir (41, 45, 70). Bu tekrar bölgeleri genom replikasyonu için gerekli olmayan; virüsün virülensini, tropizmini ve konakçı bağışıklık sistemi ile olan etkileşimleri belirleyen genleri içermektedir. Çift sarmallı genom her iki uçta kovalent ve bir uçtaki kısım çarpaz olarak hairpin ile bağlanmıştır. Capripoxvirus genomunun merkezi kısmı replikasyon için gerekli olan kapsit proteinleri ve enzimleri kodlayan gen bölgeleri içermektedir. Virüs genomunun 200'den fazla protein kodlayan gen bölgeleri içermesi, virüse zarfsız formunun da enfektif olması ve çevre şartlarına dayanıklılık olmak üzere birçok avantaj sağlamaktadır (58, 59, 128).

Capripoxvirus genusundaki virüsler, morfolojik yapılarının yanı sıra benzer antijenik bölgeleri içerdiklerinden serolojik olarak ayırt edilememektedir. Bu nedenle virüslerin isimlendirilmesi hastalığa sebep oldukları hayvan türlerine göre yapılagelmiştir. Koyunlardan elde edilen koyun çiçeği izolatları SPPV olarak isimlendirilmiş ve koyunlarda keçilere göre daha patojen olduğu belirlenmiştir. Keçilerden elde edilen keçi izolatları ise GTPV olarak isimlendirilmiş keçilerde koyunlara göre daha kolay enfeksiyon oluşturduğu ve keçilerde patojenitesinin daha yüksek seyrettiği belirlenmiştir. Sadece sığırlarda kabarcıklı deri hastalığı şekillendiren, koyun ve keçilerde hastalık oluşturmayan capripoxvirus izolatları

ise LSDV olarak adlandırılmıştır. Ancak bazı suşlar hem keçilerde hem de koyunlarda ciddi hastalık tablosu ortaya koyabilmektedirler (55, 56, 86, 87). Koyun, keçi ve sığırlar dışında bir Afrika antilobunda (*Arabian leucoryx*) capripoxvirus enfeksiyonu bildirilmiştir (72).

Son yıllarda yapılan özellikle genomik tiplendirme çalışmaları sonucunda bu iki virüsün birbirinden bağımsız iki farklı virüs olduğu netlik kazanmıştır (77). SPPV ve LSDV nükleotit düzeyinde GTPV'ye göre birbirleriyle daha yakın ilişkili bulunmuştur. SPPV ve GTPV birbirleriyle nükleotit düzeyinde % 96 ve her iki virüs de LSDV ile % 97 oranında benzerlik göstermektedir (134). Capripoxvirus ve orthopoxvirus genomlarının terminal bölgesi merkezi kısmına göre daha fazla farklılık göstermektedir. Bu bölgede yer alan P32 ve tutunma genlerinin sekans ve filogenetik analizi capripoxvirus genusu içinde bulunan virüslerin antijenik olarak benzer fakat genetik olarak farklı virüsler olduğunu ortaya koymaktadır (40, 41, 69, 73, 77, 79, 82). Capripoxvirus izolatlarının genomun terminal kısmında yer alan g-protein-coupled chemokine receptor (GPCR) gen bölgesinin konakçı spesifikliği üzerinde önemli rolleri olduğu ve her üç capripoxvirus için filogenetik olarak ayrımlarını ortaya koyabilecek farklılıklar içerdiği ortaya konulmuştur (98, 71).

### **3.2.Tarihçe**

Koyun çiçeği hastalığı Orta Asya'dan köken almış ve pek çok batı ülkesine buradan yayılmıştır. Milattan sonra ikinci yüzyıldan itibaren Asya ve Avrupa'da görüldüğüne dair bilgiler mevcuttur (80, 126). Koyun çiçeğinin bulaşma şekilleri ile ilgili çalışmalar ilk defa Bourgelat tarafından

geçekleştirilmiştir. Etiyolojisi ve hastalık oluşturabilmesi ile ilgili çalışmalar 19. yüzyılda Bourgelat ve Chauveau tarafından geçekleştirilmiş ve hastalığın etkeninin virüs olduğu Borrel tarafından tanımlanmıştır (26, 51, 97, 127). Yirminci yüzyıl ortalarında, başta Afrika ve Asya olmak üzere Avrupa ülkelerinde de hastalığın varlığı rapor edilmiştir. Bir ada ülkesi olan Büyük Britanya'da 1847-1866 yılları arasında çok sayıda koyun çiçeği salgınları ortaya çıkmış, 1866 yılında hastalık adadan eradike edilebilmiştir. Fakat diğer Avrupa ülkelerinde canlı hayvan ticaretinin devam etmesine bağlı olarak, hastalık varlığını uzun yıllar sürdürmüştür (37, 123).

Keçilerde görülen çiçek olguları ise ilk defa 1879 yılında Norveç'te rapor edilmiş, daha sonra Birinci Dünya Savaşı boyunca Makedonya'da görülmüştür. Bu hastalık 1926 yılında % 15 mortalite oranına ulaşarak bölgede yaygın olarak görülür hale ulaşmıştır. Dünya genelinde 1920'de Güneydoğu Afrika, 1923'te, Fransa, 1936'da Malezya ve Hindistan, 1938'de Fas ve Norveç, 1955'te Tacikistan, 1957 İsveç, 1982 Sudan, 1978 Amerika Birleşik Devletleri, 1983'te Irak, 1986'da Çin, Bangladeş, Yemen ve Umman, 1995'te Nijerya'da varlığı rapor edilmiştir (37, 123).

### **3.3. Epizootiyoloji**

Hastalıklı hayvanlardan virüsün saçılımı, deride bulunan lezyonların yanında genellikle burun sekresyonları, idrar ve sütle olmaktadır. Hastalığın endemik olarak görüldüğu bölgelerde hayvanların kapalı ortamlarda birarada tutulması ile doğrudan temas veya solunum ve diğer vücut sekresyonları yoluyla hastalık bulaşmaktadır. Koyun ve keçilerin dikenli ve çalimsı bitkilerin içerisinde

geçirilmesi ve böyle yerlerde otlatılmasıyla derilerinde oluşan yaralar vasıtasıyla virüs hastalıklı hayvanlardan duyarlı hayvanlara yakın temas vasıtası ile geçebilmektedir. Bunun dışında sinekler vasıtasıyla virüs mekanik olarak da taşınabilmektedir. Bulaşma deneysel olarak damar içi, deriçi ve derialtı inokulasyon yoluyla, ayrıca yapay olarak oluşturulmuş damlacıklarla hava yoluyla olabilmektedir (37, 86, 123).

Doğal koşullar altında SPPV ve GTPV oldukça konakçı spesifiktir fakat konakçı spesifikliğı konakçıdan konakçıya ve izolatlar arasında fark gösterebilmektedir. Kenya, Yemen ve Umman izolatları her iki türü de eşit olarak enfekte edebilirken Orta Asya ve Hindistan izolatları konakçı spesifik olup keçi çiçeğı virüsleri koyunları koyun çiçeğı virüsleri de keçileri enfekte edememektedir. Capripoxvirus'ların virüenslerindeki farklılıklara bağılı olarak bazı suşların sadece keçilerde hastalık oluşturabildiğı ve keçi çiçeğı virüsü olarak adlandırıldıkları, bazı suşların ise sadece koyunlarda hastalık oluşturabildiğı ve koyun çiçeğı virüsü olarak adlandırılmaktadır. Geri kalan suşlar ise her iki türde de enfeksiyon oluşturabilmektedir (37, 87, 109, 123).

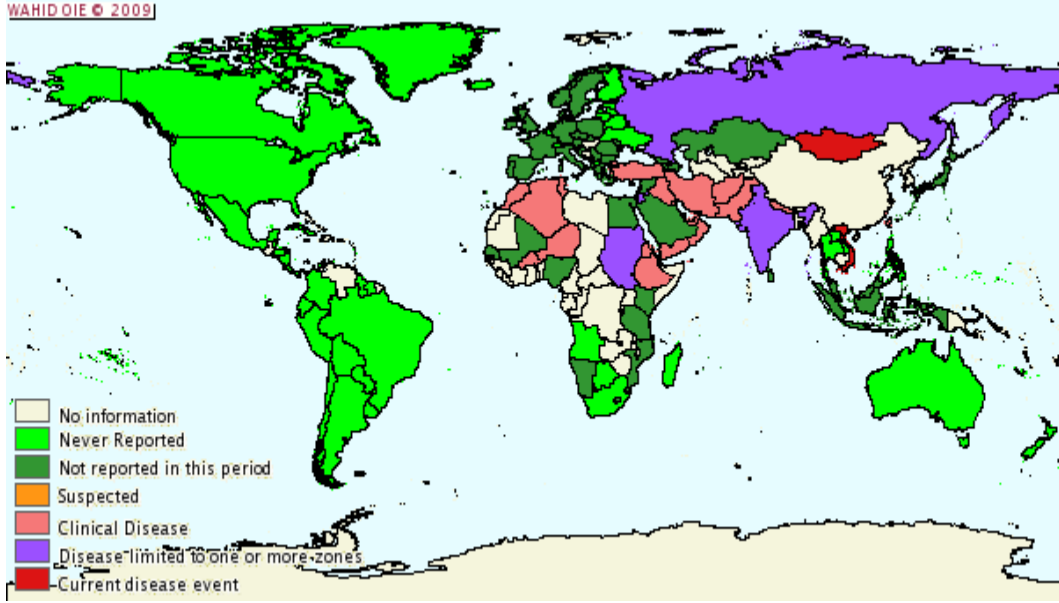
Koyun-keçi çiçeğı hastalığı değışken derecelerde mortalite ve morbidite ile ortaya çıkmaktadır. Hastalığın morbiditesi %1'den %100'e kadar değışen oranlarda olabilmektedir. Hastalık özellikle kuzularda morbidite oranı yüksek olarak seyretmekte, bölge ve mevsime bağılı olarak erişkin koyunlarda da yüksek oranlarda ortaya çıkabilmektedir. Saf ırk ve melezleme ile elde edilen kuzularda hastalığın yüksek oranda seyrettiğı kaydedilmiştir. Mortalite oranı genel olarak kuzular, toklular ve önceden aşılanmamış veya hastalık geçirmemiş koyunlarda

yüksektir. Vaka ölüm oranlarının melez kuzularda %15'den %57'ye kadar değişen oranlarda ortaya çıkabildiği ortaya konmuştur (37, 67, 123,138).

Koyun-keçi çiçeği virüsleri çevre şartlarına oldukça dayanıklıdır. Kuruma, dondurma ve çözdürme işlemlerine karşı oldukça dayanıklı olup liyofilize edilerek yıllarca muhafaza edilebilir. Virüs kirlenmiş yünde 24 saatten fazla enfektif kalamazken temiz yünde iki ay ve serumda daha uzun süre enfektivitesini devam ettirir. Normal çevre sıcaklığında virüs varlığını yıllarca sürdürebilmektedir. Virüsler çevre şartlarına dayanıklı olmakla birlikte, sıcaklığa karşı duyarlılıkları değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda 55-60°C arası sıcaklıklarda izolatların kısmen veya tamamen inaktive oldukları belirlenmiştir (37, 93, 94).

Düşük ve yüksek pH ortamlarda virüsün enfektivitesini uzun süre muhafaza edemediği ve virüsün hücre kültürü ortamında hafif alkali ortamda optimum olarak çoğalmasını devam ettirdiği belirlenmiştir. Genel olarak çiçek virüsleri eter, kloroform ve formaline karşı duyarlıdır. Fakat bazı izolatların etere karşı dirençli oldukları rapor edilmiştir (12, 37, 53).

Hastalık günümüzde Mısır, Fas, Cezayir, Suudi Arabistan, Sudan, Yemen, Umman, Irak, İran, Afganistan Pakistan Hindistan, Çin, Rusya, Moğolistan, Tayvan, Vietnam ve ülkemizde hâla görülmektedir (4, 11, 14, 33, 64). Amerika Birleşik Devletleri ve Avustralya kıtasının tamamında 2005 yılında bu yana yeni bir vaka bildirimini yapılmamıştır (Şekil 2) (14, 54, 55). Avrupa ülkelerinde hastalık eradike edilmiş olmasına rağmen, Avrupa ülkelerinden olan Yunanistan'da hastalık zaman zaman bildirilmekte ve çıkan bu salgınlardan da ülkemiz sorumlu tutulmaktadır (37, 91, 101, 123).



**Şekil 2.**Koyun-keçi çiçeği hastalığının Dünya'daki mevcut durumu (14).

### 3.4. Virüs Replikasyonu

Poxvirus replikasyon döngüsü ile ilgili detaylı bilgiler Vaccinia (inek çiçeği virüsü) virüs ile yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Virion, konakçı hücre sine plazma zarının füzyonu veya endositosis yoluyla girmektedir. Virüs kendi yapısında bulunan transkriptaz enzimi ile erken mRNA'lar ve erken genleri transkripte eder. Erken genler virüs nükleokapsitinden ayrılıp ribozomlarda translasyona uğrayarak DNA replikasyonu ve konakçının virüse karşı olan yanıtını sınırlandıran proteinlere sentezlenir. DNA replikasyonu sitoplazma içerisinde gerçekleşir. Tam uzunluktaki DNA senteziyle birlikte ara genler ve ara proteinler son olarak da geç genler ve geç proteinler translasyona uğrar. Genel olarak geç sentez edilen proteinler yapısal proteinlerdir. Virüsün tam bir virion haline gelmesi virüs fabrikaları içinde gerçekleşir. Genom burada transkripsiyonel enzimlerle birlikte paketlenir. Viral zarf şekillendikten sonra çekirdek yoğunlaşır,

kapsit proteinleri proteolitik olarak kesilir ve böylece hücre içi zarfsız erişkin virüs (IMV) şekillenir. IMV hücrenin lize olması veya protein yapısında maddeler içinde hücre dışına çıkabilir. Hücre kültüründe virüs izolasyonunda enfekte hücrelerin dondurulup çözülmesi neticesinde, hücrelerin parçalanmasıyla zarfsız erişkin virüsler ortaya çıkar. Ayrıca IMV'lerin bir kısmı virüs fabrikalarından mikrotübüller ile ayrılarak trans-golgi ağı veya endozomlar tarafından sarılarak hücre içi zarflı virüsleri şekillenir. Bu zarflı virüs mikrotübüllerle hücre yüzeyine taşınır ve burada dış zarf hücre zarı ile birlikte füzyona uğradıktan sonra virüs hücre dışına çıkar. Virüs hücre yüzeyinde bağlı durumda ise hücre ile ilişkili zarflı virüs (cell associated enveloped virus; CAEV), hücre dışında serbest kalmışsa zarflı hücre dışı virüs (EEV) olarak isimlendirilir. Hücre kültüründe virüs izolasyonu sırasında hücrelerde meydana gelen değişiklikler sonrasında hücreler kaldırılmadan toplanan üst sıvılarda bu özellikte virüsler mevcuttur. Hem IMV hem de EEV formlarının enfeksiyöz niteliğini korudukları gözlenmiştir. Fakat EEV formlarının çevresel şartlara IMV formlarında daha dayanıklı oldukları ortaya konulmuştur (128).

### **3.5. Klinik Belirtiler**

Koyun-keçi çiçeği hastalığı koyun ve keçilerde ortak belirtilerle seyretmektedir. Hastalıkta dört günden üç haftaya kadar değişen bir inkübasyon periyodunu takiben, ateş, güç solunum, durgunluk ve iştahta azalma gibi genel hastalık belirtileri ortaya çıkar. Bu dönemden sonra, genellikle genç hayvanlarda, hastalığa ait deri lezyonları oluşumu şekillenmeden ani ölümler görülebilir. Bu belirtileri takiben ölüm gözlenmeyen hayvanlarda vücudun özellikle tüysüz

bölgelerinde başlayan ve vücudun diğer bölgelerine yayılan deri lezyonları şekillenmeye başlar. Makül adı verilen yuvarlak hiperemik noktaların ortaya çıkmasıyla, bu lezyonların kabarak orta kısmının eritemli ödemi ve beyazlaşması ile papül şeklini alır. Bu lezyonlar özellikle perineum, inguinal bölge, skrotum, meme bölgesi, göz kapakları, burun ve koltuk altı bölgesinde ortaya çıkar. Ayrıca boyun, göğüs, karın bölgesi ve arka bacakların iç kısımlarına da yayılabilir. Daha sonra, lezyonun orta kısmı çöker gri nekrotik bir görünüm alır ve lezyon çevresi hiperemik bir alanla çevrilir. Hastalığın belirtilerinin ortaya çıkmasından 2- 4 hafta sonra lezyonlar kurur ve kabuklanır. Lezyonun veziküler aşamasını olan lezyonların irinli akıntılı dönemi de ortaya çıkabilir ve veziküller püstüllere dönüşür. Çiçek lezyonları nodül şeklinde görülen ve derinin epidermis ile dermis katmanlarını içine alan karakteristik oluşumlardır. Lezyonun iyileşmesinden sonra lezyonun şiddetine bağlı olarak yara izi oluşumu özellikle kılsız bölgelerde ortaya çıkabilir. Hastalıkta sekonder bakteriyel etkenlerin devreye girmesiyle yara iyileşmesinde gecikmeler şekillenir (8, 37, 87, 91, 92, 123, 125)

Klinik belirtilerin seyrine göre, hastalık genellikle perakut, akut ve subklinik olarak tanımlanmaktadır.

Perakut formda genellikle genç hayvanlarda yüksek ateş ve depresyon gibi akut hastalık belirtileri hızlı bir şekilde ortaya çıkar. Bazen de hastalığa yakalan hayvanların klinik belirtiler ortaya çıkmadan ölmektedir. Ergin hayvanlarda bu dönem hemorajik papüllerin generalize oluşumu şeklinde görülür.

Akut form, koyun- keçi çiçeğinin en sık görülen ve karakteristik formudur. Klinik belirtiler dört günden üç haftaya kadar değişen bir inkubasyon dönemini

takiben vücudun değişik bölgelerinde dört fazda ortaya çıkmaktadır. Bu fazlar; inkubasyon, invazyon veya ilerleme, patlama ve iyileşme dönemleridir. İnkubasyon periyodu dört günden üç haftaya kadar oldukça değişken bir dönemdir. İlerleme dönemi iki veya dört gün içinde sonlanmakta, genel akut enfeksiyon belirtileri olan ateş, depresyon, titreme, iştahsızlık ve solunum sayısında artış gözlenmektedir. Bu dönemde ayrıca başlangıçta seromüköz sonraları seropurulent karaktere değişen burun akıntılı rinit, fotofobi ve gözyaşı akıntısı artmış bir konjunktivitis de mevcuttur. Bu dönemden sonraki derideki belirtilerin ortaya çıktığı patlama döneminde önceki belirtiler kaybolmaya başlar. Deride çiçek hastalığına özgü sırasıyla papül, nodül ve vezikül oluşumu şeklinde ilerleyen tarzda çiçek lezyonları ortaya çıkar. Ayrıca bu dönem içerisinde bazı hayvanlarda taş çiçeği olarak adlandırılan papül çaplarının beş cm.'ye kadar ulaşabildiği keskin kenarlı nodüller şekillenir. Derinin bütün katmanlarını ve deri altı dokuyu içine alarak nekroz oluşumu ve döküntü sonrasında geride kılız bir yara izi kalır. Bu lezyonlar özellikle baş, boyun, sırt, genital organlar ve meme bölgesindedir. Bazen bu lezyonlar tüm vücudu da kaplayabilir. Bu lezyonlar günler hatta haftalarca kalır daha sonra sönerek kabuklanırlar.

Hastalık esnasında virüsün akciğere yerleşmesine bağlı olarak, enfekte hayvanlarda solunum güçlüğü'nün bir belirtisi olarak, bu hayvanlar sürünün sonunda kalır ve özellikle yokuş tırmanışlarında oldukça zorlanırlar. Akciğer formunda bakteriyel etkenlerin de devreye girmesiyle bronşiyal pnömoni ve keratitis oluşumu gibi diğer belirtiler ortaya çıkabilir.

Subklinik formdaki hastalık ise özellikle önceki yıllarda aşılınmış veya hastalığı atlatmış hayvanlarda tespit edilemeyen geçici ateş, iştahsızlık ve sınırlı sayıda deri lezyonları oluşumu ortaya çıkmaktadır (37).

Bunlar dışında atipik olarak seyreden capripoxvirus enfeksiyonlarında meningitis, koma veya gastroenteritis oluşumu bildirilmiştir. Ayrıca, hastalık esnasında şekillenen yüksek ateşe bağlı olarak zaman zaman abort vakalarının da görüldüğü rapor edilmiştir (127).

### **3.6. Patogenez**

Koyun-keçi çiçeği virüsleri dermoepiteliotropik nitelikte olup etken genel olarak solunum sistemi vasıtasıyla vücuda girer (44). Doğal enfeksiyonlarda 1-2 haftalık bir inkübasyon dönemini takiben yüksek ateş, güç solunum, depresyon ve iştahta azalma gözlenir. İnkübasyon dönemi deneysel enfeksiyonlarda ve sinekler tarafından mekanik bulaştırmada dört güne kadar düşebilmektedir. Rektal ısının 40 °C ve üzerine çıkmasını takiben, 1-5 gün içinde sırasıyla maküler, papüler, veziküler ve püstüler forma ilerleyen sonunda da kabuklanan lezyonlar ortaya çıkmaktadır. Lezyonlar özellikle derinin kılsız bölgelerinde, kasık, koltuk altı ve perineum çevresinde görülmektedir (74, 75). Duyarlı ırkların yanında hastalık çıkan bölgelere yeni getirilmiş ırklarda hastalığa ait generalize belirtiler ortaya çıkmadan ölüm gözlenmektedir. Ayrıca bağışıklık sistemi zayıf, stres altında bulunan hayvanlar, kan parazitleri ile enfekte olmuş ve gebe hayvanlar da hastalığa karşı daha duyarlıdırlar. Burun, göz, ağız, meme bezleri, vulva ve prepüsyum üzerinde bulunan papüller kısa sürede ülserleşmekte rinitis, konjunktivitis ve mastitise sebep olabilmektedir. Akciğerlerdeki lezyonlara ilave

olarak yüzeysel lenf yumruları büyümekte, özellikle preskapular lenf yumrularının aşırı büyümesi ve soluk borusuna baskı yapması neticesinde solunum güçlüğü ortaya çıkmaktadır. Lezyonlar sadece deri ile sınırlı kalmamakta, sert ve yumuşak damakta, trake, özefagus, abomazum ve kalın bağırsaklarda postmortem olarak ülserleşmiş papüllere rastlanabilmektedir (87, 103, 123).

### **3.7. Nekropsi Bulguları**

Perakut dönemde ölen hayvanlarda özellikle derinin kılsız bölgelerinde gözlenen çok az sayıdaki çiçek nodülleri dışında çoğu kez hiç lezyon görülmez. Buna karşın akut ve subklinik formda ölen veya öldürülen hayvanların nekropsisinde akciğerlerde değişik büyüklüklerde geniş, düzensiz birleşmiş kahverengi renkli alanlar belirlenir (74). Nodüler tarzdaki çiçek lezyonları genellikle farenks, soluk borusu, abomazum, akciğer, böbrek, testisler, dil, damak, özefagus ve bağırsakların müköz membranlarındadır. Özellikle akciğerde ülserleşmiş papüller oluşumlar yaygın olarak görülür. Akciğerde oluşan bu lezyonlar ölümlerin en önemli sebepleri olarak da kabul edilir (75, 111).

Klinik ve post mortem lezyonlar hayvanın türüne ve virüs suşuna bağlı olarak da değişir. Endemik koyun türleri virüse genellikle daha dirençlidir ve genellikle çok az lezyon gösterirler. Bunun yanında maternal bağışıklığı sonlanmış, bölgeye hastalığın görülmediği bölgelerden getirilmiş, aşılanmış olsa da hastalık çıkan bölgeye getirilmeleri esnasında nakliyat stresine maruz kalmış hayvanlarda ölümle sonuçlanan koyun- keçi çiçeği enfeksiyonları görülebilir (37, 111, 123).

### 3.8. Teşhis

Koyun-keçi çiçeği virüsleri hem keçi hem de koyunlarda değişen derecelerde enfeksiyon oluşturabilmektedirler. Hastalığın klinik formu belirgin olmakla birlikte kesin teşhis için laboratuvar tanıya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, aşılama yapıldığı ülkelerde, aşılanmış hayvanlarda kısmi koruyucu titrede antikora sahip olanlarda hastalığın belirtilerinin spesifik olmaması, klinik formun ektima gibi hastalıklarla karışabilmesi nedeniyle bu hayvanlarda hastalığın laboratuvar tanı ile doğrulanmasını gerektirir. Bunlara ilave olarak, hastalığın deri, solunum sistemi ve ağız içerisinde değişik derecelerde lezyonları mavidil, küçük ruminant vebası, ektima, fotosensitizasyon, dermatofiloz, böcek ısırılmaları ve bazen uyuz gibi enfeksiyöz veya metabolik hastalıklarla karışabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı klinik belirtilere bakılarak hastalıktan şüphe edilse de hastalığın laboratuvar tanısı zorunlu olmaktadır. Hastalığın birçok ülkede bildirim zorunlu hastalık olması sebebiyle de karantina uygulamasının sonlandırılabilmesi için bu hastalığın laboratuvar tanısını zorunlu kılmaktadır (12).

Virüs izolasyonu ve etkenin belirlenmesi amacıyla klinik belirti gösteren hayvanlardan deri papülleri, akciğer lezyonları, lenf yumruları, ağız ve burun svapları ile karaciğer örnekleri alınabilir. Örnek alım zamanı testin başarısı için oldukça önemlidir. Örneğin, enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) ile antijen varlığı ortaya konulacaksa örnekler hastalığın ortaya çıktığı ilk bir hafta içinde nötralizan antikorlar oluşmadan alınmalıdır. Buna karşın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) teşhisi için örnekler nötralizan antikorların oluşmasından sonra da alınabilir. Hastalığın klinik dönemi içerisinde etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve heparin içeren tüplere kan örneği alınabilir. Histopatolojik incelemeler

için lezyonlu bölgeleri içeren dokular %10'luk formalin içerisinde tespit edilmelidir ve bu örneklerin nakledilmesi için soğuk zincire ihtiyaç yoktur fakat izolasyon amaçlı değerlendirilecek numuneler alındıktan sonra + 4° C'de soğuk zincirde en kısa süre içerisinde laboratuara nakledilmez (12).

Klinik örneklerde, elektron mikroskopla virüsün belirlenmesi uzun yıllar kullanılmış olmakla birlikte, bu yaklaşımın duyarlılığı oldukça düşüktür. *Poxviridae* ailesi içerisindeki virus formları morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Diğer bir önemli kısıtlayıcı sebep de pahalı olması sebebiyle elektron mikroskopun birçok teşhis laboratuvarında olmamasıdır (88, 110, 111).

Hastalıktan şüpheli olarak ölen hayvanlardan elde edilen ve formalinle tespit edilen dokuların histolojik kesitlerinin hematoksilin-eosin (HE) ile boyanması ve bunların mikroskopik incelemesinde yoğun hücresel infiltrasyon, vaskülitis ve ödem oluşumu gözlenir. Hücresel infiltrat başlangıçta makrofajlar, nötrofiller ve bazı durumlarda eozinofillerden oluşurken, hastalığın ilerlemesine bağlı olarak makrofajlar, lenfositler ve plazma hücrelerinden meydana gelir. Capripoxvirus enfeksiyonunun karakteristik bulgusu eozinofilik görünümde, intrasitoplazmik inklüzyonlar ve içi boşalmış çekirdek içeren geniş, yıldız benzeri “koyun çiçeği hücreleri” adı verilen hücrelerin varlığıdır. Vaskülitis oluşumuna, ödem ve nekroza yol açan tromboz ve infarktüs tablosu eşlik eder. Üst solunum yollarındaki enfeksiyonlar ülserasyonla karakterizedir (43, 74, 75, 111, 137).

Koyun-keçi çiçeği hastalığının nekropsisi materyallerinin homojenizasyonu veya hücre kültürü inokulasyonu ile elde edilen üst sıvılarda virüsün tespiti ve hastalığa karşı oluşan antikorların varlığının tespiti amacıyla agar jel immüno difüzyon (AGID) homolog ve heterolog serumlar kullanılarak

yapılabilmektedir. Çalışma prensibi AGID ile aynı olan ve serumların test edilmesinde kullanılan counter immunoelectrophoresis (CIEP) testinin duyarlılığı AGID testinden daha yüksektir. Virüs nötralizasyon testi (VNT) diğer birçok virüslerin teşhisi için oldukça spesifik olmasına rağmen, mevcut olan antikorlarla virüsün kısmen bağlanması ve virüsün bağlanmada çok fazla sayıda yüzey antijenini kullanabilmesi nedeniyle, çiçek virüslerini belirlemede duyarlılığı düşüktür. Ayrıca izolasyonda kullanılan koyun, keçi ve sığır kökenli hücrelere karşı virüsün daha fazla hassasiyet göstermesi gerçek nötralizasyon testinde gerçek antikor titresini belirleyememektedir. Ancak nötralizasyonda seçilen hücrenin tipi başarıyı etkilemektedir. Örneğin, teşhiste kullanılan LT ve LK hücrelerinin kullanımı ile güvenilir sonuçlar elde edilememiş, fakat Vero hücrelerinin kullanılmasıyla hastalığa veya aşılama karşı oluşan antikorların ortaya konulması ve viral teşhis amacıyla güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Ancak tüm bu serolojik testlerde özellikle orf virüsü ile antijenik benzerlikten dolayı çapraz reaksiyonların oluşabilmektedir (12, 106, 122).

Koyun çiçeği virüsü rekombinant P32 füzyon proteinin *Escherichia coli*'de açıklanmasıyla oluşturulan indirekt ELISA testi ile hastalık sonra oluşan antikorların teşhisinde VNT ile elde edilebilenden daha kısa sürede sonuç vermesi yanısıra VNT testi ile meydana gelen orthopoxvirus ve parapoxviruslarla oluşan çapraz reaksiyonların oluşmadığı belirlenmiştir (47). Antijen tarayıcı ELISA yöntemiyle hücre kültürüne gerek kalmadan dokulardan veya hücre kültüründe virüs izolasyonunu takiben virüs varlığının ortaya konulmasını sağlamaktadır (48). İmmuno-capture ELISA metodu ile deri lezyonlarından hazırlanan süspansiyonlardan antijen varlığının ortaya konulması mümkün olmaktadır (122).

Serolojik testlerde karşılaşılan yanlış pozitiflik ve negatiflik sonuçları nedeniyle, günümüzde pek çok araştırmacı tarafından viral nükleik asitin tespitini amaçlayan genomun değişik bölgelerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı PZR işlemleri bu hastalıkların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (76, 81, 99, 100). Elde edilen PZR ürünleri kesim enzimleri ile muamele edilmesi ile SPPV ve GTPV'nin ayırımının sağlanabileceği ortaya konulmuştur (77). Ayrıca multiplaks PZR tekniği kullanılarak, capripoxviruslar ile orf virüsü ayırımlarının ayırımları gerçekleştirilmiştir (140). Capripoxvirusların konvansiyonel PZR tekniği ile birden fazla primer çifti kullanılmasıyla ayırımının yapılabileceğine yönelik bir çalışma da bildirilmiştir (116). Bunun dışında genomun terminal kısmında konakçı duyarlılığı ile ilişkili olduğu ortaya konan GPCR gen bölgesinin dizilim sonuçlarının ortaya konulmasıyla SPPV, GTPV ve LSDV arasında filogenetik olarak farklılıklar ortaya konmuştur (98)

Ayrıca Real-Time PZR tekniği ile enfeksiyonun erken dönemlerinde düşük virüs titresinin varlığında hastalık teşhisi yapılabilmektedir (30, 31, 52).

### **3.9. Virüslerin Üretildiği in-vitro ve in-vivo Sistemler**

Koyun-keçi çiçeği virüsleri koyun, keçi ve sığır kaynaklı primer ve devamlı hücre hatlarında ve bu türlere ait embriyonik hücre hatlarında değişik derecelerde çoğalabilmektedir. Bu türlere ait testis, böbrek, tiroid ve akciğer hücre hatlarında virüsün karakteristik üreme özellikleri olan hücrelerde yuvarlaklaşma, büzüşme, balonlaşma, hücreler arasında boşluklu alanların ortaya çıkması, kromatin formasyonu, hücrelerin tek tabaka görünümünün bozulması, bazofilik ve/veya eozinofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin görülmesi gibi

sitopatik etkiler gözlemlenir (7, 83, 95). Devamlı hücre hatlarından kuzu testis (lamb testis; LT), kuzu böbrek (lamb kidney; LK) ve sığır kökenli Madin-darby bovine kidney (MDBK) gibi hücre hatlarından da virüs karakteristik üreme özelliklerini devam ettirebilmektedir. Vero (African green monkey [Verda Reno] kidney; Vero) hücrelerinde de virüsün üremesini devam ettirebildiği ortaya konulmuşsa da birincil virüs izolasyonu için kullanımı önerilmemektedir (10, 27, 28, 61, 62, 83, 95, 120, 141).

Hücre kültüründe in vitro üretilmeye ilave olarak, çiçek virüsleri embriyolu tavuk yumurtalarında in vivo olarak üretilmektedir. Virüsün embriyolu tavuk yumurtası inokulasyonu ile sitoplazmik inklüzyonlar, yangı hücreleri oluşumu ve nekroz oluşumu gözlenmiştir (24, 25, 114). Kahire ve Çin izolatları, 12 günlük embriyolu tavuk yumurtasına adapte edilip üretilirken, Romanya suşu adapte edilememiştir. Koyun çiçeği virüsü 90 pasaj boyunca korioallontoik zarda üretilerek aşı olarak kullanılmıştır. Ayrıca tavuk embriyo fibroblast (chicken embryo fibroblast; CEF) hücrelerinde virüs üretimi gerçekleştirilmiştir (37).

Virüsün üretiminde kullanılan in vivo sistemler doğal konakçıları ve doğal konakçının tür benzerleridir. Virüs varlığının deneme hayvanı inokulasyonu ile gösterilmesi için en uygun model nötralizan antikor bulundurmeyen kuzulara inokulasyondur (47). Virüs Kıvırcık, Merinos koyunlarında Dağlıç, Akkaraman ve Mor Karaman koyunlarına kıyasla daha iyi üremenin şekillendiği belirtilmiştir (24). Kobay, tavşan, hamster, fare ve rat gibi laboratuvar hayvanlarında virüs çoğalmamaktadır (7, 42).

### **3.10. Capripoxvirusların Tiplendirilme Teknikleri**

Capripoxvirus genusu içerisindeki virüslerin genomik olarak kıyaslanması, bulaşma kaynağının tanımlanması, aşı suşu ile saha suşları arasındaki farklılıkların ortaya konulması ve aşı olarak kullanılacak suşların seçimi amacıyla tercih edilen yöntemler olmuştur. Bu kısımda bu amaçla en sık olarak kullanılan, kullanım kolaylığı olan ve bu çalışmada da kullanılmış olan belli başlı yöntemlerden kısaca bahsedilecektir.

#### **3.10.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz zincir reaksiyonu hedef genetik materyallerin (DNA, RNA) tamamının veya belirli uzunluktaki bir bölgesinin, spesifik kısa zincirli oligonükleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyon başlıca denaturasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve amplifikasyon (extension) olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir. PZR'nin üç aşamadan oluşan amplifikasyon aşamasının tekrar sayısı (n) sonucunda, hedeflenen DNA'ya ait bölgenin  $2^n$  adedince kopyası oluşmaktadır. Amplifikasyon aşamasından sonra elde edilen ürünler, agaroz jel jel elektroforezis ile ayrıştırılmakta, ethidium bromide ile boyanarak görünür hale getirilebilmektedir (21). Klinik materyalden veya izolasyon materyalinden SPPV ve GTPV'nin her ikisini de ayırımını gerçekleştirilmeden teşhis edebilen çalışmaların yanında Orlova ve ark. (116), SPPV, GTPV ve LSDV'yi ayırabilmesinin yanında saha suşları ile aşı suşlarını birbirinden ayırabilen multipliks PZR tekniğini geliştirmişlerdir. Bu amaçla, capripoxvirus genomunun Ankyrin Repeat Protein bölgesinde yaklaşık 700 bazlık bir kısmı öncelikli

olarak çoğaltılmıştır. Sonraki aşamada, PZR ürünleri üç farklı primer seti kullanarak çoğaltılan bölge içinde LSDV için 254 bp, SPPV için 311 bp, GTPV için ise 415 bp büyüklüğünde üç farklı bölgenin çoğaltılması sağlanmıştır.

### **3.10.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikçikli DNA'yı spesifik bölgelerden tanıyıp, kesim yapan enzimlerdir. DNA'nın, bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra ethidium bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bandlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) adı verilmektedir. Bu amaçla tam genomun farklı araştırmacılar tarafından *HindIII*, *HaeIII*, *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *SalI*, *AvaI* gibi restriksiyon enzimleri ile kesimi neticesinde capripoxvirus izolatlarının birbirleriyle yakın ilişkili oldukları, zayıflatılmış aşı suşlarının saha suşlarından daha farklı bir kesim bölgeleri içerdikleri ortaya konulmuştur (39, 40, 41, 68, 89).

### **3.10.3. PZR-RFLP**

Bu yöntem önceki belirtilen iki yaklaşımın birlikte kullanılmasıyla gerçekleştirilir. PZR-RFLP yönteminde öncelikle genomik DNA'nın, belirli bir bölgesi spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Elde edilen ürünler bir veya daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ile kesilmekte, agaroz jel elektroforez ile ayrılmakta ve jel ethidium bromid ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında görüntüleme işlemi yapılmaktadır. PZR-RFLP viroloji alanında tür ayırımında sıklıkla kullanılmakla birlikte, standardize edilemeyen restriksiyon koşullarında

kullanılan enzimlerin benzer fakat özdeş olmayan bölgelerden kesime uğraması sonucu yanlış kesim profillerinin ortaya çıkması veya enzimin kesimi için optimize şartların her zaman sağlanamaması sonucunda kesimin olmaması nedeniyle yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu durum özellikle fazla sayıda örnekle ve rutin çalışmalarda rastlanmaktadır. Ayrıca, tek bir nükleik asitteki değişim enzim kesim profilini değiştireceği için, sık mutasyon geçiren özellikle RNA genoma sahip virüslerde, RFLP’de yanlış sonuçların elde edilme ihtimali artmaktadır. Bu çalışmada da, sınırlı sayıda örnekle çalışılmasına rağmen, zaman zaman benzer olumsuzluklara bu çalışmada da rastlanmıştır. Bu nedenle RFLP’nin özellikle çok örnekle gerçekleştirilen rutin çalışmalarda yaygın kullanımını önerilmemektedir (21).

Hosamani ve ark. (77) gerçekleştirdikleri çalışmada virüsün P32 geninin PZR ile çoğaltılması ve *Hinf*III restriksiyon enzimi ile kesimi neticesinde 1000 bp uzunluğundaki GTPV’ye ait PZR ürününün 688. nükleotitten kesime uğradığı ve 2 bant oluşturduğu, SPPV’ye ait 1025 bp uzunluğundaki PZR ürününün ise 391. ve 691. nükleotitten kesime uğrayarak 3 farklı bant şekillendirdiği belirtilmiştir. Fulzele ve ark. (66) ise virüsün tutunma genlerinin PZR ile çoğaltılması ile oluşan 192 bp büyüklüğündeki ürünün *Eco*RI restriksiyon enzim kesimi ile SPPV’de 192 ve 62 bp olmak üzere 2 farklı bant şekillendirdiği GTPV’de ise kesim şekillenmediğini ortaya koymuşlardır.

#### **3.10.4. DNA Baz Dizi Analizi (Sequencing)**

Dizi analizinde öncelikle Klenow, Taq DNA polimeraz, reverse transkriptaz (RT) veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak dizisi saptanacak DNA

iplikçisinin komplementeri sentezlenmektedir. Çalışmaların çoğunda zincir uzamasının sonlandırılması yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, reaksiyon ortamında dNTP'ler yanında, deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan dideoksi nükleotit (ddNTP)'lerin de bulundurulması esasına dayanır. Sentezlenen DNA iplikçisine dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP eklenmesi halinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, primer, dNTP karışımı ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylece reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçaları poliakrilamid jelde elektroforez işlemine tabi tutulmaktadır. Dizi analiz sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Otomatize sistemlerin çoğunda reaksiyonun başlangıcında floresan veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak DNA baz dizilimi gözlenebilir hale getirilmektedir. Her iki DNA zincirinin dizi analizi yapılarak, yani ileri ve geri primerlerle çift okuma yapılarak, artefakt ve diğer faktörlere bağlı hatalar en aza indirilebilmektedir. Jele bağlı olmayan dizi analiz yöntemleri (hibridizasyona dayalı, gene-specific-chips) geliştirilerek bu problemlerin önüne geçilebilmektedir. Pahalı olması ve uygulanabilmesi için gelişmiş laboratuvar olanaklarına ihtiyaç duyulması nedeniyle her laboratuvara bu sistemin kurulması mümkün olmamaktadır. Fakat günümüzde moleküler epidemiyolojik çalışmalarda birincil başvuru aracı olarak sıkça kullanılmaktadır (113). Capripoxvirus genusu içerisinde bulunan her üç virüse ait tam genom ve genomun sadece belirli bölgelerini ifade eden dizileme sonuçlarına ulaşılabilmekte böylece ortaya çıkan izolatların öncekilerle kıyaslanması suretiyle hastalık hakkında daha detaylı bilgiler toplanabilmektedir. Yapılan tam genom

çalışmaları neticesinde SPPV, GTPV ve LSDV'nin nükleotit düzeyinde % 97 oranında benzerlik gösterdiği özellikle genomun merkezi kısmının iyi korunmuş bölgeler içerdiği belirlenmiştir (134). Genomun terminal kısmının ise ayırım yapmayı kolaylaştıracak düzeyde farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur. Capripoxviruslara ait GPCR bölgesine ait dizilim verilerinin değerlendirilmesiyle virüslerin elde izole edildiği hayvan türleri ile doğrudan ilişkili olarak filogenetik bir ayırımın yapılabildiği belirtilmiştir (98).

### **3.11. Koruma ve Kontrol**

Bu hastalıkla mücadelede alınan tedbirler, diğer hastalıklarda da olduğu gibi hastalığın o ülkedeki veya bölgedeki durumuna göre değişmektedir. Bu nedenle, sözkonusu tedbirler ülkesel veya zaman zaman da bölgesel olabilmektedir.

Koyun-keçi çiçeği hastalığından ari ülkelerin pek çoğu hastalığın kontrolünde enfekte ülkelerde hayvan hareketlerinin ve ticaretin kısıtlanması, hastalık çıkan bölgelerde sıkı karantina tedbirlerinin uygulanması, zorunlu kesim ve enfekte alanların dezenfekte edilmesi gibi kontrol yöntemlerini kullanmaktadırlar. Hastalığın bölgesel seviyede görüldüğü veya ülkemizde olduğu gibi endemik olarak seyrettiği ülkelerde genel hijyenik tedbirlere ilave olarak, hastalık çıkan bölgeler ve riskli bölgelerde her yıl aşılama yapılmaktadır. Ülkeler arası canlı hayvan ticaretinin ve sınırlardan kontrolsüz hayvan geçişlerinin mümkün olduğu bölgelerde aşılama ilaveten sıkı karantina tedbirlerinin uygulanması hastalığın yayılmasının önlenmesinde önemlidir. Ayrıca virüsün deri, yün ve dışkı gibi ortamlarda uzun süre varlığını ve enfektivitesini uzun süre

devam ettirebilmesinden dolayı hastalık çıkan bölgelerde deri ve yün gibi hayvansal ürünlerin de hastalık bölgesinden çıkarılmaması, barınaklardaki altıkların uzaklaştırılarak imha edilmesi ve barınak ortamlarının dezenfekte edilmesi hastalığın yayılmasını önleme için gerekmektedir (12, 16).

Kolostrumla veya dışarıdan antikorlar verilmiş hayvanlarda generalize enfeksiyona karşı koruyuculuk şekillenmektedir. Hastalığı atlatmış hayvanlardan alınan elde edilen serum veya SPPV antiserumu tek başına herhangi birinin ya da karışımlarının hastalık görülen hayvanlarda tedavi amaçlı kullanımının başarılı olduğu bildirilmiştir. Ancak en etkili korunma virüse maruz kalan hayvanlarda şekillenir. Aşılınmış veya hastalıktan iyileşmiş hayvanlarda serum nötralizan antikor seviyeleri ile hastalıktan korunma arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Nötralizan antikor varlığı virüsün vücutta yayılımını engellemekte fakat virüsle enfekte hücreleri elimine edememektedir. Bu hücreler ise hücresel bağışıklık yoluyla elimine edilmektedir (37).

Koyun-keçi çiçeği hastalığına karşı en etkili koruma yaklaşımı aşılamaadır. Koyun-keçi çiçeğine karşı koruma amaçlı ilk aşı uygulaması, ovinasyon adı verilen ve enfekte yara kabuğu materyalinin deride oluşturulan çizik üzerine sürülmesi veya gliserinli tuzlu su içerisinde hazırlanan süspansiyonun deri altına inokulasyonu şeklinde yapılmıştır. Bu uygulama yeterli bilgisi olmayan kişiler ve çiftçiler tarafından Hindistan ve Orta Asya ülkelerinde yüzyıllarca ticari aşı uygulamalarının başladığı yakın zamana kadar uygulanmıştır. Bu uygulamadan sonra, uygulama bölgesinde nodül oluşumu gibi lokal reaksiyonlar, ateş ve generalize hastalık tablosunun oluşumu görülmektedir. Bu uygulama ile inoküle edilen virüs miktarı bilinmediği gibi virüsün doğal konakçılarında pasajlanması

ile patojenitesi artabilmekte ve hızlı yayılabilen virüslerin ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (32, 37, 46).

SPPV ile virüs antiserumun karıştırılarak 15-18 °C'de üç günlük inkübasyonu ile elde edilen karışımın inokulasyonu ile on gün içinde koruyuculuğun şekillendiği, altı aya kadar devam ettiği belirtilmiştir (6). Bu uygulama Bulgaristan, Yugoslavya, Macaristan, Pakistan, Fransa, Cezayir ve Afrika Fildişi sahillerinde başarılı bir şekilde denenmiştir. SPPV Bükreş suşu aynı yolla aşı olarak kullanımı denenmiş, generalizasyon şekillenmesi ve hastalığın yayılması gibi yan etkilerinin olduğu belirtilmiştir (6, 37, 127).

Virüslerin inaktive edilerek aşı olarak kullanılması koyun-keçi çiçeği hastalığı için de denenmiş, SPPV'nin değişik suşları formaldehit, etanol, bütanol, eter, anilin, kristal viole, borik asit, fenol, sodyum mertiolet, beta propiolakton, hidroksyletilamin, ısı ve ultraviole gibi değişik metodlarla inaktive edilmiş virüslerin alüminyum hidroksit, saponin, sodyum merthiolet, yağ, thiomersol ve süttozu gibi koruyucu maddelerle karıştırılarak hazırlanan türevleri elde edilmiştir (115, 121, 131). Ancak inaktif aşılar kısa süreli bağışıklık şekillenmesi yanında, kullanılan adjuvantın niteliğine bağlı olarak soğuk havalarda uygulamada kullanılan şırınga ve iğnelerin tıkanması, yüksek doz kullanma gereksinimi, zaman zaman inokulasyon bölgesinde nekroz ve abse oluşumu ile ölüme kadar uzanan durumların ortaya çıktığı belirtilmiştir (37). İnaktif aşılarla aşılama sonucunda T ve B lenfositleri sayılarının artmadığı belirtilmiştir (50).

Son yıllarda inaktif aşıların yerine zayıflatılmış canlı aşılar tercih edilmektedir. SPPV Perego, Bakırköy, Cezayir, Kenya, Karnal, Pendik, RM/65, SP/RH, Mathura, SP8, Jaipur, Ranipet, Haydarabad, Moritanya, Romanya-Fanar,

Kazakistan, Chitinsk ve Moğolistan suşları kullanılarak kuzu testis, böbrek ve tiroid, buzağı böbrek ve fotal kas, fotal koyun böbrek, akciğer ve deri hücreleri yanında Vero ve BHK-21 hücrelerinde zayıflatılması sonucu aşılar geliştirilmiştir ( 1, 5, 26, 37, 78, 90, 123). Kuzu testis hücrelerinde üretilen Romanya suşunun uygulanması ile 24 ay (6), koyun tiroid hücrelerinde SPV-Ranipet suşunun üretilerek uygulanması ile 23 ay (50), RM/65 suşunun uygulanması ile 22 ay ve Perego M suşu ile 18 aylık, bir bağışıklık sağlandığı belirtilmiştir (119).

Genel kullanımı olan tek başına çiçek virüsünü içeren aşılarla ilave olarak, formalin ile hazırlanmış koyun çiçeği-antraks ve koyun çiçeği- koyun clostridial enfeksiyonlarına karşı elde edilen aşı 4-6 aylık 48 kuzuda denenmiş, etkenlerden hiçbirine karşı immun yanıtın baskılanmadığı belirtilmiştir (84). Capripoxvirus RM/65 suşu ile PPR attenüe 75/1 suşu ile yapılan kombine aşı ile Capripoxvirusa karşı yeterli titrede nötralizan antikor oluşumuna rağmen, keçilerde deneysel enfeksiyonları engellemede başarısız olduğu tespit edilmiştir (107). Benzer bir çalışmada, antraks ile koyun çiçeği aşısının birlikte kullanımıyla antraksa karşı kobaylarda koruyuculuk belirlenirken koyun çiçeğine karşı da koyunlarda koruyuculuk şekillendiği belirlenmiştir (2, 9).

Koyun-keçi çiçeği hastalığı ve küçük ruminant vebası hastalığına yönelik hücre kültüründe virüslerin zayıflatılarak birlikte aşı olarak kullanımının yanısıra ilaveten SPPV ve GTPV genomu üzerinde küçük ruminant vebası virüsü (PPRV) için immunojenik hemagglutinin proteininin açıklanması ile elde edilen aşılarla da her iki hastalık için koruyucu düzeyde bağışıklık şekillendirilebildiği belirtilmiştir (34, 49, 56).

Koyun çiçeği virüsü aşısı ile keçilerin aşılınması, keçi çiçeği virüsü aşısı ile koyunların aşılınması ile her iki hayvan türünde de çarpaz bağışıklığın orta çıktığı fakat koruyuculuk düzeylerinin homolog aşılar kadar yüksek olmadığı belirtilmiştir (23). Ayrıca SPPV aşısı ile ektima aşısı arasında yapılan çarpaz bağışıklık çalışmalarında kısmi koruyuculuk ortaya çıktığı orta konulmuştur (22).

Hastalığa karşı kullanılan antiviral etkili ilaç bulunmamaktadır. Fakat *Acacia arabica* ve *Eugenia jambolana* bitki ekstraktlarının in-vitro olarak GTPV üzerinde antiviral etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (38).

Ülkemizde koyun-keçi çiçeği hastalığına karşı sıklıkla koyun çiçeği Bakırköy suşunun Vero hücre hattına adaptasyonu ile 65. pasaj sonucunda zayıflatılmasıyla elde edilen canlı aşı kullanılmaktadır (17, 18, 19). Günümüzde zorunlu bir aşı kampanyası mevcut olmasa da her yıl kamu ve özel veteriner hekimler tarafından bu aşılama ilkbahar ve sonbahar aşılama kampanyası şeklinde uygulanmaktadır. Ayrıca hastalık çıkan karantina bölgesinde hastalığa yakalanmamış risk altındaki hayvanlara zorunlu olarak aşı uygulanmaktadır (15,16).

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Hücre Kültürü

Virüs izolasyonu ve virüs nötralizasyon testleri MDBK ile Vero hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelerin üretilmesinde Penicilin-Streptomycin-Amphotericin B solüsyonu içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya ) vasatı kullanıldı.

### 4.2. Virüs

Hücre kültürü, nötralizasyon ve PZR aşamalarında kontrol virüs olarak koyun çiçeği attenüe aşı suşu (Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü [PVKAE] koyun-keçi çiçeği Ülkesel Referans Laboratuvarından temin edildi. Moleküler filogenetik çalışmalarda kullanılmak üzere, bu çalışmada elde edilen izolatlarla ilave olarak, ülkemizin değişik yerlerinden izole edilmiş koyun-keçi çiçeği virüs izolatları yine aynı laboratuardan sağlandı (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışma kapsamında değerlendirilmek üzere temin edilen virüsler.

<b>Virüs tanımı</b>	<b>Kaynak</b>
İran SGPV aşısı	PVKAE
GTPV Denizli 34.pasaj	PVKAE
GTPV Denizli 5. pasaj	PVKAE
Çorum SPPV	PVKAE
Van SPPV	PVKAE
Elazığ SPPV	PVKAE
Van2 SPPV	PVKAE
İstanbul SPPV	PVKAE
Karasu SPPV	PVKAE
MalatyaSPPV	PVKAE
Çanakkale	PVKAE

### **4.3. Föetal Dana Serumu**

Virüs izolasyonu ve hücrelerin üretilmesi aşamalarında kullanılmak üzere föetal dana serumu (FDS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ticari olarak temin edildi.

### **4.4. Örneklerin Toplanması**

Bu tezde Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nün görev alanına giren Kuzeydoğu Anadolu Bölgesindeki 5 ilde (Erzurum, Ağrı, Iğdır, Erzincan, Kars) ortaya çıkan koyun-keçi çiçeği hastalığından şüpheli 11 hastalık mihrakına gidilerek alınan örnekler ve yine bu mihraklardan enstitüye laboratuvar tanısı amacıyla gönderilmiş ölü hayvanlardan temin edilen örnekler kullanıldı (Tablo 2). Çiçek lezyonları gözlenen hayvanlardan deri ve kuyruk altı, ağız ve dil üzerinde bulunan veziküllerden ve deri kazıntılarında aseptik şartlar altında örnekler alındı. Hastalık gözlenen sürülerde ölmüş hayvanlardan deri, akciğer, karaciğer ve lenf yumrusu örnekleri alındı. Bu örnekler 1/10 oranında antibiyotik (%1'lik 10 000 IU [International Unite] penisilin/ml, 10 mg streptomisin/ml ve 0,025 mg/ml Amphotericin B) içeren DMEM vasatı içeren steril tüpler içine toplanarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Örnekler homojenizasyon aşamasına kadar bekletilmek üzere -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

**Tablo 2.** Çalışmada kullanılan örneklerin elde edildiği numunelere ait bilgiler.

<b>Mihrak No</b>	<b>Mihrak Adı</b>	<b>Örneklenen Hayvan sayısı</b>	<b>Materyal Sayısı</b>	<b>Serum sayısı</b>	<b>Örnekleme Zamanı</b>
<b>1</b>	Ağrı/Doğubeyazıt	5 kuzu	16	3	Şubat 2007
<b>2</b>	Iğdır/Aralık	4 kuzu	11	2	Mart 2007
<b>3</b>	Erzurum/ Aşkale	2 kuzu	7	3	Mart 2007
<b>4</b>	Erzurum/Hınıs	5 kuzu	13	5	Mart 2007
<b>5</b>	Erzurum/Merkez	7 kuzu	23	2	Nisan 2007
<b>6</b>	Erzurum/Tekman	4 kuzu	14	2	Nisan 2007
<b>7</b>	Erzurum/Ilıca	5 kuzu	19	2	Nisan 2007
<b>8</b>	Erzincan/Tercan	2 kuzu	6	2	Mayıs 2007
<b>9</b>	Ağrı/ Diyadin	2 kuzu	7	2	Mayıs 2007
<b>10</b>	Kars /Digor	2 kuzu	7	2	Şubat 2008
<b>11</b>	Erzurum/Çat	15 keçi/oğlak	45	5	Mayıs 2008
<b>TOPLAM</b>		<b>53</b>	<b>168</b>	<b>32</b>	<b>2007-2008</b>

#### **4.5. Serum Örneklerinin Hazırlanması**

Hastalıklı hayvanlardan kaolinli tüplere alınan kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 1500 devirde 10 dak santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Elde edilen serum örnekleri 2 ml eppendorf tüplere porsiyonlanarak -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

#### **4.6. Doku ve Svap Örneklerinin İşlenmesi**

Koyun-keçi çiçeği şüpheli 11 hastalık mihrağından 38 koyun/kuzu'ya ait 38 deri, 16 akciğer, 16 karaciğer, 16 lenf yumrusu ve 37 svap olmak üzere 123 örnek ve 15 keçi/oğlağa ait 15 deri, 5 akciğer 5 karaciğer, 5 lenf yumrusu ve 15 svap örneği olmak üzere 45 örnek doku parçalayıcıda homojenize edildi. Daha sonra +4°C 3000 devirde 10 dak. santrifüj edilerek biyogüvenlik kabini içinde 0,45 µm çaplı enjektör filtreden (Millipore Corp. ABD) geçirildi. Her örnek 2 ml

hacimli 5 adet tüpe aktarıldı. Bu örnekler PZR ve hücre kültürüne ekim aşamalarına kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

#### **4.7. Doku Örneklerinden Virüs İzolasyonu**

PZR sonuçları ile mihraklardaki olguların koyun-keçi çiçek hastalığı olduğu doğrulandıktan sonra, her bir mihrak için birer hayvanın PZR pozitif çıkan doku homojenatlarının karışımından hücre kültürüne ekim yapıldı. Bu amaçla 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kaplarına (Nunc Co, Roskilde, Danimarka ) 10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde MDBK hücre süspansiyonu konularak % 10'luk FDS ilavesi ile 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Hücre gelişimi takip edildi ve % 90 tek tabaka olmuş hücelere, hücre üretme vasatı döküldükten sonra, 0,5 ml izolasyon materyali inokule edildi. Hücre kültür kabı 37 °C'de 1 saat adsorbsiyona bırakıldı. Adsorbsiyon süresi sonunda hücreler serumsuz DMEM vasatı ile yıkandı ve %1'lik FDS içeren idame vasatından kaplara 5 ml ilave edilerek, hücreler 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Yedi gün süre ile doku kültürü mikroskopunda hücrelerde meydana gelen değişiklikler günlük olarak kontrol edildi. Hücrelerin vasatları 2 günde bir taze vasatlarla değiştirdi. Sitopatik etkiler kontrol virüs ekimi yapılan hücre kültür kapları ile kıyaslanarak gerçekleştirildi. Yedi gün sonunda hücre kültür kapları -80 °C'de donduruldu. Daha sonra hücre kültürleri 37 °C'de'de su banyosunda çözüldü. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Kap içerikleri santrifüj tüplerine (Vivantis Technologies Sdn. Bhd. Selangor, Malezya ) alınıp, 2000 devirde 10 dak. santrifüj edildi. Üst sıvılarda koyun-keçi çiçeği virüsü varlığını nötralizasyonla belirlemek, genomu varlığı yönünden varlığını PZR ile göstermek ve stok virüs kaynağı oluşturmak için, üst sıvılar

küçük hacimler halinde dondurma tüplerine (Biosigma SRI, Venedik, İtalya) bölündü ve -80°C'ye kaldırıldı.

#### **4.8. Hiperimmün Serum Elde Edilmesi**

SPPV ve GTPV'nin hücre kültürü izolasyonunda varlığının gösterilmesi amacıyla tercih edilen virüs nötralizasyon testinde kullanılmak üzere, nötralizasyon testinden önce hiperimmün serum elde edilmiştir. Bu amaçla Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biriminden temin edilen İsviçre beyaz fareleri, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen Penpox Koyun-keçi Çiçek aşısı kullanılarak immunize edildi. Çalışmada her biri beş fareden oluşan dört grup oluşturuldu. Sırasıyla üç gruba 0,1 ml., 0,2 ml., 0,5 ml. aşı solüsyonu ve son gruba ise 0,5 ml. PBS'nin birer hafta ara ile üç enjeksiyonu yapıldı. Üçüncü haftanın sonunda gruplardaki her bir hayvandan 200 µl geçmemek üzere kuyruk altı venasından kan alındı. Toplanan kanlar 2000 devirde 20 dak. santrifüj edilerek serumları ayrıştırılarak eppendorf tüpler içerisine konulur. Serumlar kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

#### **4.9. Kontrol Virüsün Üretimi ve Virüs Titrasyonu**

Hastalık çıkan mihraklardan toplanan kan serumlarında antikor titresinin ortaya konulması ve hücre kültüründe izole edilen virüslerin nötralizasyon testi ile varlığının ortaya konulması amacıyla öncelikle Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsünden temin edilen koyun-keçi çiçeği aşı suşunun titrasyonu OIE yönergeleri doğrultusunda Vero hücre kültüründe gerçekleştirildi. Bu amaçla

-196 °C'de muhafaza edilen Vero hücreleri çözdürülerek 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarında % 10'luk FDS içeren DMEM vasatı ile 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakıldı. Vero hücreleri hücre kültür kaplarında monolayer olduktan sonra hücre üretme vasatı uzaklaştırıldı. Hücre yüzeyleri iki defa serumsuz DMEM vasatı ile yıkandı. Koyun-keçi çiçeği aşısı suşundan 1 ml. hücreler üzerine ilave edilerek 37°C'de adsorbsiyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler serumsuz DMEM ile yıkandı. Hücreler üzerine % 1 oranında FDS içeren DMEM vasatı bırakıldı. Hücrelerde CPE oluşumu şekillendikten sonra hücre kültür kapları -80 °C'deki derin dondurucuya kaldırıldı. Daha sonra hücre kültürleri 37°C'de su banyosunda çözüldü. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Kap içerikleri santrifüj tüplerine alınıp, 2000 devirde 10 dak. santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı -80 °C'de muhafaza edildi.

Virüs titrasyonu Frey ve Liess (65), tarafından belirtilen metoda göre gerçekleştirildi. Bu amaçla virüs aşısı suşunun DMEM vasatı ile Log 10 tabanına göre 10<sup>-1</sup>'den 10<sup>-8</sup>'e kadar dilüsyonu gerçekleştirildi. Her dilüsyon basamağında 96 gözlü mikrotitrasyon kabının (Nunc Co, Roskilde, Danimarka) dört gözünden her birine 100 µl bırakıldı. Virüs kontrolü için dört gözden her birine 50 µl DMEM ve 50 µl sulandırılmamış virüs bırakıldı. Hücre kontrolü için ise dört gözden her birine % 5 oranında FDS içeren DMEM vasatından 50 µl bırakıldı. Virüs dilüsyonu basamakları, virüs kontrol ve hücre kontrol gözlerinden her birine 50 µl hücre (3x10<sup>5</sup>/ml) ilave edildi. Mikrotitrasyon kabı üzeri toksik olmayan şeffaf bantla kaplandıktan sonra 37 °C'lik inkübatöre bırakıldı. Hücreler hergün CPE yönünden kontrol edildi ve virüslerin titrasyonları DKID<sub>50</sub>/0,1 ml olarak Kaerber metoduna göre belirlendi (65, 85, 106).

#### **4.10. Nötralizasyon İndeksinin Belirlenmesi**

Nötralizasyon indeksi testinde sulandırılmış virüs-sabit serum yöntemi kullanılarak kan serumu alınan koyun ve keçilerdeki SPPV ve GTPV'ye karşı oluşan nötralizan antikorların gücü saptandı. Bu amaçla herbir serum, pozitif ve negatif kontrol serumlar 1:5 oranında DMEM vasatı ile dilüe edilerek 56 °C'de 30 dak. tutularak inaktive edildi. İnaktive edilen serumlar 96 gözlü mikrotitrasyon kabının gözlerine ikişer adet tekrarlı olmak üzere 50'şer µl bırakıldı. Üzerine 50 µl 100 DKID<sub>50</sub> /0,1 ml' den başlayarak Log 10 tabanına göre dilüe edilmiş virüs ilave edildi. Mikrotitrasyon kapları 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucukların her birine 100 µl Vero hücreleri (3x10<sup>5</sup>/ml) ilave edildi ve örnekler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7 gün tutuldu. Hücreler her gün CPE oluşumları yönünden kontrol edildi. Sonuçlar CPE'nin engellenmesi kriterine göre değerlendirilerek nötralizasyon indeksi Karber metoduna göre hesaplandı.

Çalışma kapsamında, ayrıca, izole edilen virüslerin nötralizasyon testi ile identifikasyonu amacıyla yukarıda belirtilen yöntemle nötralizan antikor titresi belirlenen pozitif kontrol serum kullanılarak sabit virüs-dilüe serum yöntemi ile virüsün varlığı ortaya konuldu.

#### **4.11. PZR**

##### **4.11.1. DNA Ekstraksiyonu**

Viral DNA ekstraksiyonu için daha önceden hazırlanan doku süspansiyonu örneklerinin her birinden 100 µl alındı. Üzerine 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya), 20 mM β-mercaptoethanol (EMD Biosciences, Inc., San Diego Ca, USA, ), 20 mM EDTA

(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ve 20mg/ml Proteinase-K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) içeren denaturasyon solusyonundan 100 µl ilave edildi. Örnekler 56 °C'de iki saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince tüpler belirli aralıklarla karıştırılarak sindirim işleminin etkili olması sağlandı. İnkübasyon sonunda örnekler oda sıcaklığına soğutulularak üzerlerine eşit miktarda fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1, v/v; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ilave edilip altüst edildikten sonra 13000 devirde beş dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst faz yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 2,5 katı saf etil alkol ve 1/10 miktarında 5 M sodyum asetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) (pH 5,3) ilave edilerek -20 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün 13000 devirde beş dak. santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine bir ml % 70'lik etil alkol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) edilerek 13000 devirde beş dak. santrifüj tekrar edildi. Üst sıvılar uzaklaştırılarak tüpler kurumaya bırakıldı. Pelet üzerine 50 µl DEPC'li (Diethyl pyrocarbonate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) distile su ilave edilerek sulandırıldı (135).

#### **4.11.2. DNA Miktarının Belirlenmesi**

DNA miktarı spektrofotometre (Beckman-Coulter DU 530 Spectrophotometer; Beckman Inst. Fullerton, CA, ABD) ile ng/µl olarak belirlendi.

### 4.11.3. Virüs Teşhisine Yönelik PZR

PZR ürününün çoğaltılması için *Taq* DNA polimeraz enzimi (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 10 mM dNTP karışımı (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya), 10x PZR Buffer (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya) ve primerler kullanılarak Tablo 3’de yer alan PZR karışımı hazırlandı. PZR aşamasında kullanılan primerlerin lokalizasyonları ve son ürünle ilgili olarak beklenen büyüklükler Tablo 4’de verilmiştir. Amplifikasyonda Inverted Terminal Repeats (ITRs) genomu uç kısımlarında bulunan tekrarlı bölgelere özgül daha önce yayınlanmış bir makaleden alınan Ins-1.1/ Ins-1.1’ primerleri kullanıldı (99).

PZR ürünlerinin amplifikasyonları ısı döngü cihazı (Thermo Hybaid Px2 Thermal Cycler; Thermohyaid US, Franklin, MA, ABD) kullanılarak 95 °C’de 5 dak. 1 döngü denaturasyon aşamasını takiben, 95 °C’de 1 dak, 55 °C’de 1 dak, 72 °C’de 1 dak. 35 döngü ve son uzatma aşaması olarak 72 °C’de 10 dak. olarak gerçekleştirildi (99) .

PZR’nin tüm aşamalarında pozitif kontrol olarak Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nden temin edilen aşı suşu, negatif kontrol olarak da distile su kullanıldı.

PZR çalışması aşamasında klinik örneklerde çalışmaya geçmeden önce titresi belirlenen kontrol virüsle PZR deteksiyon limiti belirlendi. Bu amaçla virüsün 1:2 oranında sulandırılmalarında PZR işlemi gerçekleştirildi.

**Tablo 3.** PZR karışımının içeriği.

<i>Taq</i> DNA polimeraz	1 µl (5u/ µl)
10 X <i>Taq</i> buffer	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
Primer miks (20 pmol/µl)	2 µl
DNA örneği	5 µl
Distile su	76 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>100,0 µl</b>

**Tablo 4.** PZR’de kullanılan primerler ve beklenen ürün büyüklüğü.

Primer	Dizin (5’→3’)	Uzunluk (bp)	T <sub>m</sub>	Lokalizasyon bölgesi başlangıcı	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>Ins-1.1/1.1’</i>	aga aac gag gtc teg aag ca	20	60,13	452	289
	gga ggt tgc tgg aaa tgt tg	20	59,97	740	

#### 4.11.4. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Öncelikle 150 ml. erlenmayer içerisine 0,5 gr. agaroz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) bırakıldı. Üzerine 50ml 1X TAE (Tris-Asetat –EDTA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) tamponu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Jelin 50-55<sup>0</sup>C’ ye soğuması beklendi ve jele 0.5µg/ml etidyum bromid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ilave edildi. Hazırlanan % 1 lik agaroz, jel tarağı yerleştirilmiş jel tablasına döküldü. Agarozun donması için 15 dak. beklendi. Taraklar çıkartıldı ve jel tablası elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünleri, 5 kısım ürün, 1 kısım 6X yükleme boyası (10mM Tris-HCl, %0,03 bromophenol blue, %60 gliserol, 60mM EDTA, Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya) oranında karıştırılarak toplam dokuz µl hacminde jel tarakları yardımı ile açılan gözlere

aktarıldı. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için, PZR ürünleri ile birlikte 1µl 100 bp'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) yüklendi. Jele 8 volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dak. süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar jel dokümantasyon sistemi (GeneLine, ImageSCI System; Pittsburgh, PA, USA) yardımı ile görüntülendi.

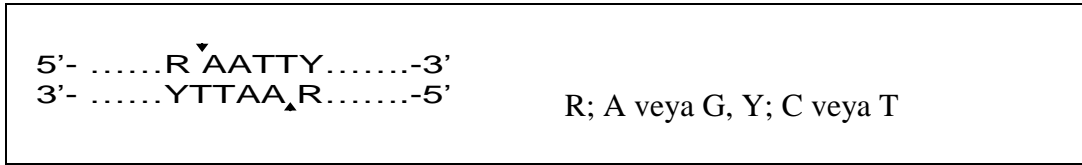
#### **4.12. Restriksiyon Enzim Kesimi**

##### **4.12.1. PZR Ürününün Pürifikasyonu**

PZR pozitif ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesimden pürifikasyon kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Corp. Madison WI, USA) kullanılarak pürifiye edildi. Yapılan bu protokolün amacı, PZR ürününden primerler, nükleotitler ve tuzların uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla; 40 µl PZR ürünü, 5 hacim tampon solüsyonu ile karıştırıldı. Bu karışım özel döndürme kolonları (spin column) içine konulup. 2 ml'lik toplama tüplerine (collection tube) yerleştirildi. Tüpler 14000 devirde 5 sn. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpleri boşaltıldı ve kolonlar tekrar içlerine yerleştirildi. İçlerine 300 µl yıkama tampon solüsyonu eklenerek tekrar 14000 devirde beş sn. santrifüj edildi ve toplama tüpleri santrifüj işleminden sonra boşaltıldı. Kolonlar çıkarılarak 1,5 ml. hacimdeki eppendorf tüplerinin içine yerleştirildikten sonra 25 µl. elüsyon tampon solüsyonu kolonun ortasına gelecek şekilde eklendi. Tüpler beş dak. oda ısısında bekletildikten sonra 14000 devirde 30 sn. santrifüj edilen pürüfiye PZR ürünü kesim için hazır hale getirildi.

#### 4.12.2. Kesim Aşaması

Çoğaltılan PZR ürünü içerisinde SPPV ve GTPV'nin ayırımına imkan sağlayacak uygun restriksiyonun belirlenmesi için öncelikle Capripoxvirus'ların ITRs bölgesinin restriksiyon enzim kesim bölgeleri online Gene Tool programı kullanılarak belirlendi (Şekil 3). Bu analizlere göre *XapI* (*Apo I*) enzimi ile kesimin her iki virüsün ayırımına imkan sağlayabileceği belirlendi. Bu enzimin SPPV ve GTPV'nin restriksiyon tanıma bölgesi Şekil 4 ve 5' de gösterilmiştir.



**Şekil 3.** *XapI* (*Apo I*) Enzimi restriksiyon tanıma bölgesi.

*XapI* (*ApoI*) restriksiyon enzimi kesim deneyi enzimin temin edildiği firmanın (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya) tarif ettiği protokole göre gerçekleştirildi. Kısaca; kesim aşaması için öncelikle 10X NE buffer (1 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, pH 7.9)'dan 2,5 µl, 100X BSA (Bovine Serum Albumin, Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya)'dan 2,5 µl, 15 µl pürifiye PZR ürünü, 20 µl *ApoI* enzim (10,000 U/ml) ve 10 µl dH<sub>2</sub>O içeren toplam 50 µl.'lik karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım 16 saat 50°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonrasında karışım 80°C'de 20 dak. inkübasyona bırakılarak enzim aktivitesinin sonlanması sağlandı.

Kesim sonuçları kesim ürünlerin beş kısım ürün, bir kısım 6x yükleme boyası oranında karıştırılarak toplam 9 µl hacminde jel tarakları yardımı ile açılan

gözlere aktarıldı. Ürün büyüklüğünün belirlenebilmesi için, kesim ürünleri ile birlikte 1µl 100 bp lik DNA merdiveni (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanya) yüklendi. Jele sekiz volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dak. süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. Oluşan bantlar jel dokümantasyon sistemi yardımı ile görüntüldü.





#### 4.13. Filogenetik Analiz İçin Uygun Gen Bölgelerinin Seçimi ve PZR

Çalışma kapsamında elde edilen izolatların ve ülkemizde daha önceden izole edilmiş SPPV ve GTPV izolatları arasında filogenetik kıyaslama için capripoxviruslarda oldukça değişken olan genomun terminal bölgelerinde yaklaşık 1000 nükleotitlik iki farklı bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu amaç için primerler gen bankasında capripoxviruslara ait olan sunulmuş dizilimler kullanılarak BLAST programı ile tarafımızdan oluşturulmuştur. PZR işlemi Tablo 5’de belirtilen primerler ve Tablo 6’de belirtilen karışımlar kullanılarak ısı döngü cihazı ile 95 °C’de 5 dak. bir döngü, 95 °C’de bir dak, 55 °C’de bir dak ve 72 °C’de bir dak. 35 döngü ve 72 °C’de 10 dak. bir döngü olarak gerçekleştirildi. Çoğaltılan PZR ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütülerek oluşan bantlar jel dokümantasyon sistemi yardımı ile görüntülendi. Ağırlık markeri ile kıyaslanarak beklenen büyüklükte amplifikasyon ürünü elde edilen örnekler kaydedildi.

**Tablo 5.** Filogenetik inceleme için kullanılan primer dizilimleri.

Primer	Dizin (5’→3’)	Uzunluk (bp)	Tm	Lokalizasyon bölgesi	Ürün büyüklüğü	
SGPV primeri	F	acgaggtctcgaagcaatac	22	54,4	SPPV 197-1594	1397
	R	ccacagtgtgctaagag	18	49,7	GTPV 88-1529	1441

**Tablo 6.** PZR karışımının içeriği.

<i>PlatinumTaq</i> DNA polimeraz	1 µl (5u/ µl)
10 X <i>Taq</i> buffer	10 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
Primer miks (20 pmol/µl)	2 µl
DNA örneği	5 µl
Distile su	76 µl
<hr/>	
TOPLAM	100,0 µl

#### 4.14. Dizileme

PZR ürünleri sekansa gönderilmeden önce pürifikasyon kiti sistemi kullanılarak 4.12.1.'de tarif edildiği gibi pürifiye edildi. Daha sonra, pürifiye ürünler ticari ABI 310 Genetic Analysis System (Refgen Biyoteknoloji, Ankara) kullanılarak çift yönlü okumaları yaptırılarak diziletildi Dizileme sonuçları Mega 4 programı kullanılarak capripoxvirus genomuna ait gen bankasında mevcut dizilimleri ile kıyaslandı (132).

## 5. BULGULAR

### 5.1. Klinik ve Nekropsi Bulguları

Erzurum ve çevre illerden ortaya çıkan klinik olarak koyun-keçi çiçeği şüpheli sürülerin tamamında etkilenen hayvanların büyük kısmının 0-4 ay arası genç hayvanlar olduğu gözlemlendi. Hastalık çıkan sürülerdeki toplam 1620 kuzu ve oğlaktan 243'ünün hastalıktan etkilendiği ve toplam 2350 koyun ve keçiden ise sadece 15'inde hastalığa ait belirtilerin şekillendiği belirlenmiştir. Hastalığa bağlı ölümlerin ise sadece 189 kuzu ve oğlaklarda şekillendiği, koyunlarda ise ölüm görülmediği belirlenmiştir (Tablo 7).

Sürülerde bir yaş ve üzeri hayvanların bir önceki yıl aşılansmış olduğu hayvan sahipleri tarafından ifade edildi. Hastalık belirtileri gözlenen hayvanlarda perakut ve akut ölümlerin yanı sıra, yüksek ateş, burun akıntısı, durgunluk ve iştahsızlık gibi genel semptomların olduğu tespit edildi. Perakut ölüm şekillenen hayvanlarda deri ve iç organlarda hastalığa ait herhangi bir belirti gözlenmezken, hastalık seyrinin 3 günü aşığı olgularda canlı hayvanlarda özellikle derinin kılsız bölgeleri, koltuk altı bölgelerde bir ile üç arası değişen sayılarda papüler, veziküler görünümde lezyonlar ile ilerlemiş vakalarda püstüller tarzda açılmış ve sekonder enfeksiyonların varlığı tespit edildi. Hastalık belirtilerinin bir haftayı aşığı vakalarda iyileşme olduğu, iyileşmeyen ve ilk bir hafta içerisinde ölen hayvanların nekropsisinde yine derinin kılsız bölgelerinde, ağız ve göz çevresinde papüler ve püstüller lezyonlar, iç organlardan, özellikle de akciğerlerde, değişken sayıda çiçek lezyonları varlığı saptandı. Lenf yumrularının hafif yangılı olduğu diğer iç organlarda lezyon gözlenmedi. Sadece bir olguda özefagusta ve dilde

nodüler tarzda lezyonların varlığı belirlendi. Mıhraklara ait klinik ve nekropsi bulguları Tablo 8’de verilmiştir.

**Tablo 7.** Mıhraklardaki hayvan sayıları ve hastalıktan etkilenenlerin dağılımı.

Mıhrak	Sürüdeki Toplam hayvan sayısı		Hastalanan hayvan sayısı		Ölen Hayvan sayısı	
	Kuzu/Oğlak	Koyun/Keçi	Kuzu/Oğlak	Koyun/keçi	Kuzu/Oğlak	Koyun/keçi
1	40	100	15 Kuzu	0	15 kuzu	0
2	400	750	100 kuzu	0	60 kuzu	0
3	160	200	30 kuzu	5 koyun	25 kuzu	0
4	100	150	5 kuzu	0	5 kuzu	0
5	80	100	12 kuzu	10 koyun	10 kuzu	0
6	200	260	20 kuzu	0	15 kuzu	0
7	160	200	20 kuzu	0	15 kuzu	0
8	250	280	10 kuzu	20 koyun	12 kuzu	0
9	180	200	16 kuzu	0	12 kuzu	0
10	20	50	7 kuzu	0	10 kuzu	0
11	30	60	18 Oğlak	0	10 oğlak	0
<b>Toplam</b>	1620	2350	243	15	189	0

**Tablo 8.** Mihraklara ait klinik ve nekropsi bulguları.

<b>Mihrak</b>	<b>Klinik bulgular</b>	<b>Nekropsi Bulguları</b>
<b>1</b> Ağrı/ Doğubayazıt	Yüksek ateş, durgunluk, iştahsızlık, perakut ölümler	Kuyruk altı, arka bacakların iç kısımları ve ağız içinde 1-3 adet lezyon mevcut olup, iç organlarda belirgin bir lezyon bulunmamakta.
<b>2</b> Iğdır/Aralık	Yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Ağızda ve derinin kılsız bölgelerinde 1-3 adet nodül, akciğerlerde apikal kısımlarda 1-8 adet nodül mevcut olup, diğer iç organlarda lezyon bulunmamakta.
<b>3</b> Erzurum/ Aşkale	Kuzularda yüksek ateş durgunluk perakut ölümler, sürüde birkaç koyunda durgunluk, iştahsızlık, burun akıntısı, deride ve ağız içinde çiçek nodülleri. Koyunlarda ölüm yok	Kuzularda derinin kılsız bölgelerinde, ağızda ve akciğerlerde çiçek nodülleri mevcut olup, diğer iç organlarda lezyon bulunmamakta.
<b>4</b> Erzurum/ Hınıs	Yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Ağız çevresinde ve kuyruk altı bölgesinde püstülleşmiş lezyonlar, akciğerlerde 1-5 adet nodül mevcut olup, diğer organlarda lezyon bulunmamakta.
<b>5</b> Erzurum/Merkez	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler, Sürüde çok az sayıda koyunda yaygın olmayan nodül gözlemlendi. Koyunlarda ölüm yok.	Ağız çevresinde ve kuyruk altı bölgesinde püstülleşmiş lezyonlar ve akciğerlerde 1-5 adet nodül mevcut olup, diğer organlarda lezyon bulunmamakta.
<b>6</b> Erzurum/Tekman	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Lezyon bulunmamakta.
<b>7</b> Erzurum/ Ilıca	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Kuzularda derinin kılsız bölgelerinde ve ağızda nodül var. Akciğerlerde 1-5 adet nodül mevcut.
<b>8</b> Erzincan/ Tercan	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler, Sürüde çok sayıda koyunda yaygın olmayan nodül gözlemlendi.	Kuzularda ağız çevresi, dil, özefagus ve akciğerlerde yaygın nodüller mevcut.
<b>9</b> Ağrı/Diyadin	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Kuzularda derinin kılsız bölgelerinde ve ağızda çiçek nodülleri, akciğerlerde 1-5 adet nodül. Mezenteriyel lenf yumruları hiperemik görünümde.
<b>10</b> Kars / Digor	Kuzularda yüksek ateş, durgunluk, perakut ölümler	Kuzularda derinin kılsız bölgelerinde çiçek nodülleri mevcut olup, ağızda ve iç organlarda lezyon bulunmamakta.
<b>11</b> Erzurum/ Çat	Oğlaklarda yüksek ateş, perakut ölümler	Oğlaklarda sırtta ve boyunda yaygın nodüller, koltuk altı, kuyruk altı ve arka bacağın iç kısımlarında püstülleşmiş lezyonlar ve akciğerlerde 1-5 adet nodül gözlemlendi.

## 5.2. PZR Sonuçları

Bu çalışmada koyun-keçi çiçeği hastalığı yönünden şüpheli canlı ve ölü toplam 53 hayvandan alınan farklı organ ve dokulara ait toplam 168 örnek PZR ile çalışılmıştır. Öncelikle şüpheli tüm hayvanların çalışılan en az bir örneğinde PZR ile pozitiflik tespit edilmiştir. Bu nedenle tüm hayvanların koyun-keçi çiçeği olduğu belirlenmiştir. Elde edilen PZR ürünlerine ait görüntü Şekil 6'da verilmiştir. PZR sonuçlarına göre canlı ve ölü hayvanlardan temin edilen deri örneklerinin % 96,2 (51/53)'sinde, nazal ve oral svap örneklerinin % 76,9 (40/52)'unda pozitiflik saptanırken ölü hayvanların nekropsisi sonucu temin edilen akciğer örneklerinin % 90,4 (19/21)'ünde, karaciğer örneklerinin % 42,8 (9/21)'sında, lenf yumrusu örneklerinin % 61,9 (13/21)'unda pozitiflik tespit edilmiştir. Böylelikle, çalışılan toplam 168 örnekten 132 (% 78,5)'sinin koyun-keçi çiçeği yönünden pozitifliği belirlenmiştir. Toplanan örneklerin PZR testi sonuçları Tablo 9'de ve materyal türüne göre PZR pozitiflik sayıları ve oranları Tablo 10'da verilmiştir.



**Şekil 6.** PZR ürünlerinin etidyum bromidle boyanmış jel görüntüsü. M: Marker, 1-11: Mihrak listesindeki sıralamaya göre örnekler, 12: Pozitif kontrol, 13:Negatif kontrol (dH<sub>2</sub>O).

**Tablo 9.** Organ ve dokulardan elde edilen PZR sonuçları.

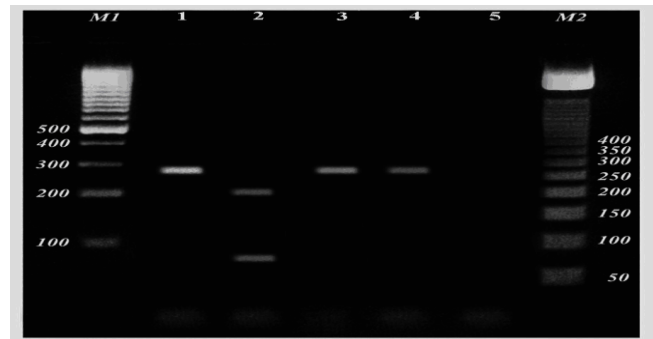
Mihrak no	Hayvan No	Deri	Akciğer	Karaciğer	Lenf yumrusu	Oral ve nasal svap
1	1	+	+	-	+	+
	2	+	-	-	-	+
	3	+				+
	4	+				+
	5	+				+
2	1	+	+	-	-	+
	2	+				-
	3	+				+
	4	+				-
3	1	+	+	+	+	-
	2	+				-
4	1	+	+	-	-	-
	2	+	+	-	+	-
	3	+				-
	4	+				+
	5	+				-
5	1	+	+	+	+	+
	2	+	-	-	-	+
	3	+	+	-	-	-
	4	+				-
	5	-				+
	6	+				+
	7	+				-
6	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	-	+
	3	+				-
	4	+				+
7	1	+	+	-	+	+
	2	+	+	-	-	+
	3	+	-	-	-	+
	4	-				+
	5	+				+
8	1	+	+	+	+	+
	2	+				
9	1	+	+	-	+	+
	2	+				+
10	1	+	+	-	-	+
	2	+				+
11	1-5	+	+	+	+	+
	6-15	+				+

**Tablo 10.** Materyal türüne göre PZR pozitiflik sayıları ve oranları.

Materyal türü	Materyal adedi	Pozitif materyal sayısı	Pozitiflik oranı
Deri	53	51	% 96,2
Akciğer	21	19	% 90,4
Karaciğer	21	9	% 42,8
Lenf yumruları	21	13	% 61,9
Oral ve nasal svap	52	40	% 76,9
<b>TOPLAM</b>	<b>168</b>	<b>132</b>	<b>% 78,5</b>

### 5.3. PZR-RFLP Analizi

Virüs genomunun ITRs bölgesinin belirtilen primerlerle PZR amplikasyonu ile elde edilen ürünlerin *XapI* (*ApoI*) enzimi ile kesimi ile çalışma kapsamında izole edilen virüslerin tamamında 89 ve 200 bp büyüklüğünde 2 bant şekillendirmiştir. Aynı şekilde keçiden izole 11 numaralı mihraka ait keçi izolatu da koyun izolatında olduğu gibi çift bant şekillendirmiştir. Fakat Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edilen keçi izolatlarının kesim analizinde tek bantın oluşarak restriksiyon enzimi ile kesim şekillenmediği gözlenmiştir. Bir koyun ve keçi izolatına ait PZR ürünlerinin *XapI* (*ApoI*) enzimi ile restriksiyon enzim kesim analizi ürünleri Şekil 7’ de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** PZR-RFLP Analiz sonuçları. M1:Marker, 1: Pendik keçi çiçeği izolatu -1, 2: Koyun çiçeği izolatu, 3: İran koyun keçi çiçeği aşısı suşu, 4: Pendik keçi çiçeği izolatu- 2, 5: Negatif kontrol (dH<sub>2</sub>O).

#### 5.4. Virüs İzolasyonu

Toplam 11 hastalık odağından temin edilen ve PZR ile pozitif bulunan doku homojenizatların her mihrak için farklı olarak hazırlanan inokulumların % 90 tek tabaka olmuş MDBK hücre kültürü ortamına ekimleri neticesinde hücrelerin birçoğunda üçüncü günden sonra CPE görülmeye başladı. İnokulum verilmemiş kontrol hücreleri ile kıyaslandığında, ekim yapılan hücre kültür kaplarında ilk belirlenen sitopatik görüntü hücrelerin yuvarlaklaşması şeklinde belirlendi. Ekim yapılan hücre kültür kaplarının tamamında yedinci günde CPE oluşumu ve bu kaplardaki tek tabaka hücrelerin bir çok bölgesinde lokal olarak hücrelerin parçalanıp kalktığı gözlemlendi. Bu nedenle kör pasajlara gerek duyulmadı ve yedinci günün sonunda ekim yapılan hücre kapları ile birlikte hücreler üç defa dondurulup çözdürüldü. Üst sıvılar elde edilip, -80°C'ye kaldırıldı. Bu üst sıvılarla gerçekleştirilen PZR neticesinde, üst sıvıların tamamında koyun-keçi çiçeği virüsünün varlığı tespit edildi. Elde edilen izolatlara ait titreler Tablo 11'de sunulmuştur.

Tablo 11. İzolatlar ve referans virüse ait titre değerleri.

<b>İzolat İsmi</b>	<b>Titreler (DKID<sub>50</sub>/0,1 ml)</b>
Koyun-Keçi çiçeği Aşı Suşu	10 <sup>-5,75</sup>
Ağrı/ Doğubayazıt	10 <sup>-3,25</sup>
Iğdır/ Aralık	10 <sup>-3,25</sup>
Erzurum/ Aşkale	10 <sup>-3,0</sup>
Erzurum/ Hınıs	10 <sup>-3,5</sup>
Erzurum/ Merkez	10 <sup>-4,5</sup>
Erzurum/ Tekman	10 <sup>-4,5</sup>
Erzurum/ Ilıca	10 <sup>-5,5</sup>
Erzincan/ Tercan	10 <sup>-3,75</sup>
Ağrı/ Diyadin	10 <sup>-4,0</sup>
Kars / Digor	10 <sup>-4,5</sup>
Erzurum/ Çat	10 <sup>-4,75</sup>

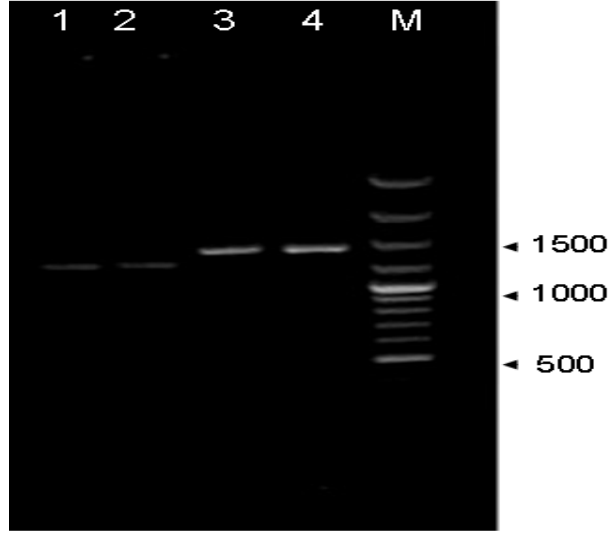
### **5.5. Nötralizasyon İndeksi**

Mihraklardan tamin edilen kan serumlarla yapılan nötralizasyon indeksi sonuçlarına göre hastalık görülen hayvanların nötralizan indeksleri  $\log.10^{0,5}$ 'den düşük bulunmuştur. Hastalık görülmeyen hayvanlarda ise  $\log.10^{2,0}$ 'den yüksek oranlarda nötralizasyon indeksi tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında hastalık görülen hayvanlarda koruyucu olarak kabul edilen titrelerden daha düşük oranlarda antikor varolduğunu göstermektedir. Hastalık görülmeyen hayvanlarda ise dört hayvanda ise koruyucu olarak kabul edilen  $\log.10^{1,5}$  altında nötralizasyon indeksi tespit edilmesine rağmen herhangi bir klinik bulguya rastlanılmamıştır.

Aynı serumların MDBK hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen virüs nötraliasyon testinde virüs nötralizasyon titreleri negatif serumla gösterilenden farksız bulunmuş ve nötralizasyon indeksleri hesaplanamamıştır.

### **5.6. Filogenetik Analiz Amacıyla Gerçekleştirilen PZR**

Bu amaçla seçilen bölgenin PZR ile çoğaltılması neticesinde markerler ile kıyaslamada SPPV için beklenen 1397 bp uzunlukta ve GTPV için ise beklenen 1440 bp uzunluğunda PZR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 8). Bu motife göre bu çalışmada elde edilen tüm klinik izolatların koyun izolatları olduğu kanaatine varıldı. Ancak, doğrulama amacıyla olarak dizileme sonuçları değerlendirildi.



**Şekil 8.** Filogenetik dizileme için elde edilen PZR ürünlerinin görünümü. M: Marker, 1: Referans koyun çiçeği virüsü, 2: Koyun çiçeği izolatu (Digor/Kars), 3: Referans keçi çiçeği virüsü (İran aşu suşu), 4: Referans keçi çiçeği izolatu (Denizli).

### 5.7. DNA Dizileme Sonuçları

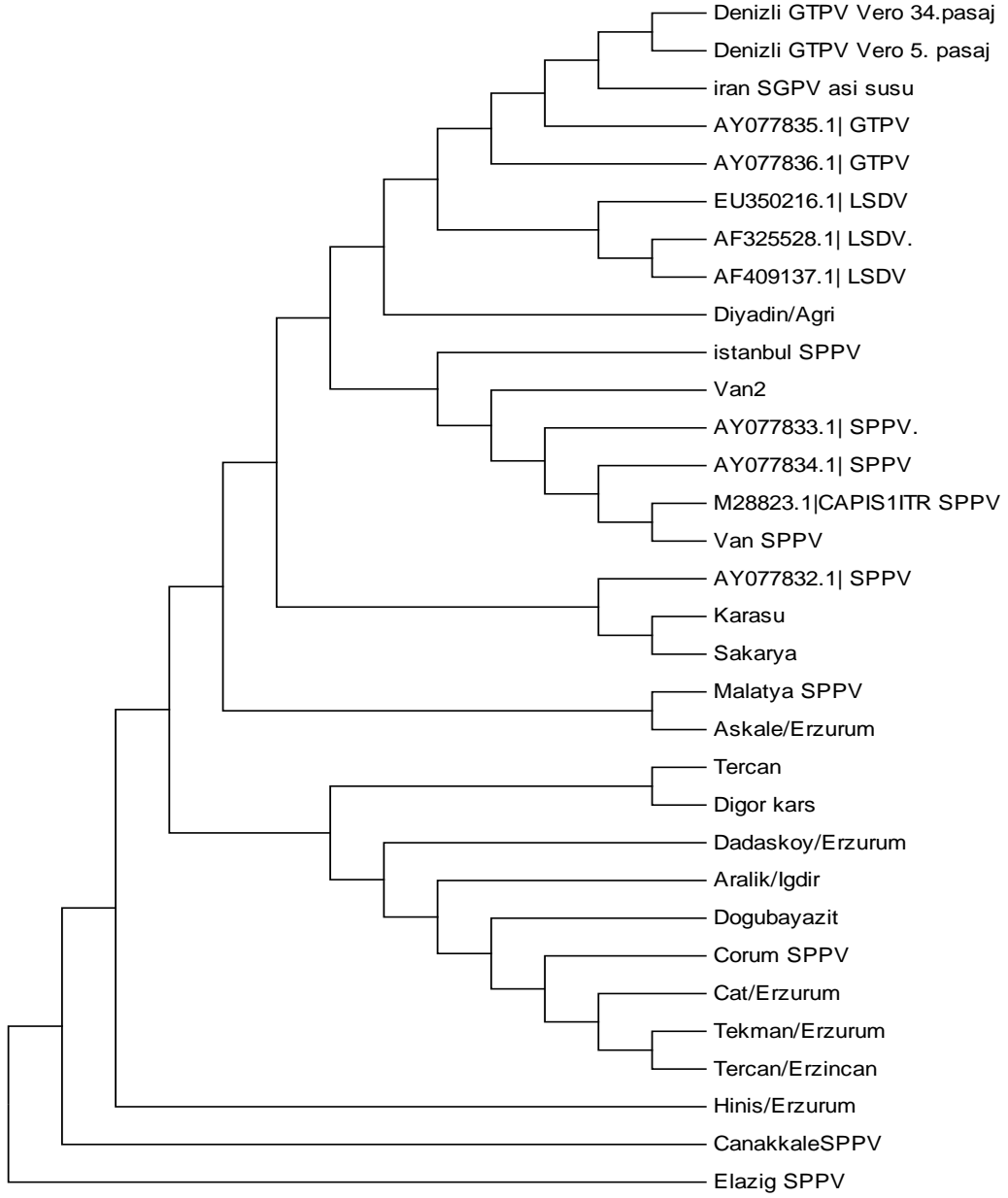
Filogenetik analiz amacıyla elde edilen gen ürünlerinin jelde pürifiye edilmesinden sonra gerçekleştirilen sekanslama neticesinde, keçilerde izole edilenler dahil, tüm klinik izolatların SPPV olduğu doğrulandı. Elde edilen dizilemesinde koyun izolatına ait Digor/Kars izolatına ait dizilimle kontrol keçi çiçeğine ait dizilimin genbankasında yer alan referans SPPV(AY077834) ve GTPV(AY077835) gen dizilimleriyle kıyaslanması Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12’de kıyaslamalar dikkate alındığı zaman kıyaslanan bölge için ülkemiz keçi izolatların dizilimlerinin % 99,5 oranında diğer ülke izolat dizilimlerine benzer olduğu tespit edildi. Aynı durumunun ülkemiz ve diğer ülkelerin koyun izolatları arasında da söz konusu olduğu yani koyun izolat dizilimlerinin birbirlerine % 99,5 oranında eşleştiği görüldü. Koyun izolatları ile keçi izolatları arasında kıyaslanma yapıldığı zaman ise kıyaslanan bölge için % 96

arasında benzerlik tespit edildi. Her iki virüs türü için farklılık gösteren bölgelerin belirli bir alanda yığıldığı (kıyaslanan bölge için 500. nükleotide 1200. nükleotitler arası) kaydedildi.

Elde edilen dizilimlerin gen bankasında mevcut diğer dizilimler ile kıyaslanması ile elde edilen bootstrap konsensus filogenetik ağacı Şekil 9’da gösterilmiştir.





**Şekil 9.** Neighbor-Joining metoduyla çizilmiş olan bootstrap konsensus filogenetik ağacı.

## 6. TARTIŞMA

Bu çalışma Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde bulunan beş ilde (Erzurum, Ağrı, Iğdır, Erzincan ve Kars) ortaya çıkan koyun-keçi çiçeği şüpheli 11 mihrakta klinik belirti gösteren hayvanların değişik doku ve organlarından elde edilen örneklerle gerçekleştirilmiştir. Vakaların virolojik ve serolojik yönden incelenmesine ilave olarak, hastalık mihraklarındaki hayvan popülasyonu, hastalıktan etkilenen hayvanların yaşı, aşılama durumu hakkında da bilgiler toplanarak hastalığın epizootiyolojisi irdelenmiştir.

Koyun-keçi çiçeği hastalığının ülkemizde varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (93, 94, 106). Gülbahar ve ark. (74), 2000 yılında yayınladıkları çalışmalarında 1998 yılında Van'da ortaya çıkan salgınlarda virüs varlığını hastalıktan etkilenmiş kuzuların çeşitli organ ve dokularında immunohistokimyasal yöntemlerle ortaya koymuşlardır. Oğuzoğlu ve ark. (112), 2006 yılında yayınladıkları çalışmalarında 2003 yılında Çankırı bölgesinde ortaya çıkan salgınlardan virüsün varlığını virüs izolasyonu, elektron mikroskop, PZR yöntemiyle belirlemişlerdir. Eröksüz ve ark. (64), 2008 yılında yayınladıkları çalışmalarında 2004-2006 yılları arasında Elazığ ve Bingöl yöresinde ortaya çıkan salgınlarda etkilenen 4-7 haftalık kuzularda hastalığın varlığını histopatolojik olarak ve PZR ile ortaya koymuşlardır. Özmen ve ark. (117), 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında Burdur bölgesinde koyun çiçeği varlığını histopatolojik olarak belirlemişlerdir. Mevcut tezde virüsün varlığı PZR ve virüs izolasyonu ile ortaya konmuş olmakta birlikte, aynı zamanda hastalığa sebep olan virüslerin tiplendirilmesi de gerçekleştirilmiştir.

Hastalık geçmişte olduğu gibi günümüzde de tüm dünyada yaygın olarak varlığını sürdürmektedir. OIE verilerine göre Afrika'da Ekvator'un kuzeyi, Ortadoğu, Orta Asya, İran Afganistan, Pakistan, Hindistan, Nepal, Çin ve Bangladeş gibi ülkeler koyun-keçi çiçeği hastalığının endemik olarak görüldüğü bölgeler olarak tanımlanmıştır. Azerbaycan, Bahreyn, Bangladeş, Burkino Faso, Etiyopya, Cezayir, Ürdün, Lübnan, Moğolistan, Fas, Umman Somali, Tunus 2009 yılında hastalığın bildirildiği ülkeler olarak kaydedilmiştir (13).

Hastalığa bağlı morbidite ve mortalite oranlarının tespitine yönelik çalışmalara rastlanmıştır (29, 35, 133, 136, 139). Bu oranların % 1'den % 100'e kadar değişen oranlarda olabileceği bildirilmiştir (29, 139). Hastalığa bağlı morbiditenin özellikle kuzular, toklular ve daha önceki yıllarda aşılammış veya hastalığa yakalanmamış hayvanlarda yüksek olduğu, mortalite oranının ise kuzularda yüksek olarak seyrettiği rapor edilmiştir (35, 133, 136). Vaka ölüm oranlarının % 15,78 ile % 57,9 arasında değiştiği ve en yüksek vaka ölüm oranının ise melez kuzularda ortaya çıktığı ifade edilmiştir (108). Mevcut çalışmada hastalık çıkan sürülerde hayvan sayısı 1620 kuzu/oğlak ve 2350 koyun/keçi olarak tespit edilmiştir. Morbidite oranı kuzu ve oğlaklarda % 15, koyun ve keçilerde % 1,4 olarak belirlenmiştir. Mortalite oranları ise kuzu ve oğlaklarda % 11,6 olarak tespit edilirken koyun ve keçilerde % 0 olarak belirlenmiştir. Vaka ölüm oranı kuzu ve oğlaklarda % 77 olarak bulunurken koyun ve keçilerde ölümlere rastlanmamıştır. Bu bulgular daha önce yapılan çalışmaların bulgularını teyit eder nitelikte bulunmuştur.

Aşılamalar sonucunda oluşan humoral immun yanıtın ölçülmesinde referans yöntem olarak virüs nötralizasyon testi kullanılmaktadır. Nötralizasyon

testi sonucunda belirlenen nötralizasyon indeksi ile koruyucu düzeyde antikor varlığının olup olmadığına karar verilebilmektedir. Nötralizasyon indeksi  $\log_{10}^{1.50}$  ve üzeri olarak bulunan serum örnekleri pozitif olarak kabul edilmektedir (12). Martin ve ark. (106), koyun çiçeği aşısı uygulamasından sonra oluşan nötralizasyon indeksinin  $\log_{10}^{0.80}-10^{3.0}$  arasındaki değerlerde saptandığında hayvanların bağışık olduğunu,  $\log_{10}^{0.50}-10^{0.79}$  arasındaki değerlerin şüpheli kabul edileceğini saptanan antikor titrelerinin şüpheli değerler olduğunu,  $\log_{10}^{0.49}$ 'dan düşük değerlerin ise bağışık olmayan koyunlarda saptacağını bildirmişlerdir. Erhan ve ark. (63), attenuue Bakırköy koyun çiçek aşısı ile aşılanmış koyunlarda bağışıklığın saptanmasında elde edilen antikor titrelerinin  $\log_{10}^{0.00-0.50}$  arası değerleri negatif,  $\log_{10}^{0.51-0.80}$  değerleri arası şüpheli ve  $\log_{10}^{0.81}$ 'den yukarı değerleri pozitif olarak değerlendirmişlerdir. Mevcut tezde hayvanlardaki antikor titreleri de irdelenmiştir. Çalışma sonucunda hastalık görülen hayvanların antikor titrelerinin  $\log_{10}^{0.5}$  düşük bulunmuştur. Hastalık görülmeyen hayvanlarda ise  $\log_{10}^{0.5}$  ile  $10^{2.0}$  arasında değişen oranlarda nötralizasyon indeksi tespit edilmiştir. Tezdeki ilgili çalışmanın verileri daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Virüslerin hücre türlerine karşı hassasiyetlerinin farklı olduğu ve bu nedenle nötralizasyon sonuçlarının hücre türlerine göre farklılık arz edebileceği tespit edilmiştir (12, 106). Bu nedenle, mevcut tezde nötralizasyon çalışması iki farklı hücre hattı (MDBK ve Vero) ile gerçekleştirilmiştir. Bu yapılan çalışmanın bulgularında Vero hücrelerinin nötralizasyon deneyi için daha güvenilir olduğu görülmüştür. Bu sonuç ise OIE'nin nötralizasyon testinde Vero'yu önerisi ile paralellik göstermektedir.

PZR alışmaları son yıllarda, koyun-keçi çiçeği hastalığı teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (99, 100, 104, 112, 129). Daha önce yapılan PZR ile geleneksel metotların kıyaslandığı bir çalışmada Mangana-Vougiouka ve ark. (100), SPPV teşhisinde 40 şüpheli örnekten hücre kültürü ve PZR ile tamamını, direkt floresan testi (DIFA) ile 29'unu, agar jel immunopresipitasyon testi (AGIPT) ile 16'sını pozitif olarak tespit etmişler, PZR'nin duyarlılığını %100, DIFA'nın duyarlılığını % 73 ve AGIPT'nin duyarlılığını ise % 40 olarak belirlemişlerdir. Oğuzoğlu ve ark. (112), virüs izolasyonu, elektron mikroskop, PZR yöntemiyle yaptıkları çalışmada PZR metodunu kısa sürede sonuç veren ve duyarlı bir metot olarak önermektedirler. Bu tezde PZR'nin her hangi bir test ile kıyaslanması yapılmamıştır. Bu nedenle duyarlılığına ilişkin bir verimiz olmamakla birlikte, klinik olarak iek şüpheli olguların kısa sürede koyun-keçi çiçeği ile enfekte olduğunun belirlenmesi dikkate alınarak, PZR'nin bu hastalığı teşhisi veya doğrulanmasında tercih edilebileceğini önermekteyiz.

Viral teşhisin başarısı, teşhiste kullanılan metotun seçimi kadar doğru örneğin kullanılması ile de ilişkilidir. Bu konuyla ilgili yapılmış olan çalışmalara rastlanmıştır. Bowden ve ark. (43), deneysel olarak enfekte edilmiş koyun ve keçilerde Capripoxvirus enfeksiyonunun doku tropizmini kantitatif Real-Time PZR tekniği ortaya koydukları çalışmalarında en yüksek virüs saçılımının inokulasyondan sonraki 10. ve 14. günler arasında nazal, konjuktival ve oral sekresyonlarla olduğunu, inokulasyondan sonraki günlerde virüs konsantrasyonun en yüksek olarak inokulasyon bölgesinde, ikinci olarak deri lezyonlarında, daha az olarak akciğerlerde bulunduğunu kaydetmişlerdir. Gülbahar ve ark. (74), doğal enfekte kuzuların dokularında immunohistokimyasal boyama yöntemi ile deri ve

akciğer örneklerinin 6/6'sında, burun mukozası örneklerinin 2/6'sında, mediastinal lenf yumrusu örneklerinin 2/6'sında virüs varlığını gösterirlerken incedikleri karaciğer örneklerinde herhangi bir bulguya rastlamamışlardır. Mevcut tezde PZR çalışmasında en yüksek pozitiflik % 96,2 deri örneklerinden en düşük pozitiflik ise % 42,8 ile karaciğer örneklerinde ortaya konmuştur. Çalışmada nazal ve oral svap örneklerinin % 76,9'unda pozitiflik saptanırken, akciğer örneklerinin % 90,4, lenf yumrusu örneklerinden ise % 61,9'unda pozitiflik tespit edilmiştir. Tüm doku ve organların toplamında ise % 78,5 oranında koyun-keçi çiçeği yönünden PZR pozitiflik belirlenmiştir. Bu verilere göre, canlı hayvanda hastalığın teşhisinde öncelikle deri, daha sonra nazal svap örneklerini, ölü hayvanlarda ise bu dokulara ilaveten, akciğer örneklerinin tercih edilmesinin PZR ile teşhiste güvenilir sonuçlar alınmasını sağlayacağı kanaatine varılmıştır. Çalışmanın verileri her zaman tek bir örnekte çalışmanın sakıncalarını da ortaya koymaktadır. Bu bakımdan teşhis amacıyla en az iki farklı örnekle çalışılmasını önermekteyiz.

SPPV ve GTPV'nin ayrımının PZR-RFLP yöntemi ile gerçekleştirilmesine yönelik farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hosamani ve ark. (77), virüs P32 geninin PZR ile çoğaltılması ve elde edilen ürünün *Hinf I* restriksiyon enzimi ile kesimi neticesinde SPPV'de 300, 327 ve 400 bp büyüklüğünde 3 farklı bant oluşurken, GTPV'de 327 ve 697 bp büyüklüğünde iki bant şekillendirdiğini belirtmişlerdir. Fulzele ve ark. (66), virüs tutunma gen bölgesinin PZR yöntemiyle çoğaltılması neticesinde koyun izolatlarında 191 bp, keçi izolatlarında ise 191 ve 472 bp olmak üzere iki bant şekillendirdiği göstermişlerdir. Aynı çalışmada, PZR ürünlerinin *EcoRI* restriksiyon enzimi ile yapılan kesim işleminde koyun

izolatlarının 129 ve 62 bp büyüklüğünde iki bant şekillendirdiğini keçi izolatlarının ise kesilmediğini ortaya koymuşlardır. Mevcut tezde 289 bp uzunluğundaki koyun-keçi çiçeği virüsü varlığını gösteren PZR ürününün genbankasında bulunan SPPV ve GTPV dizilimleri karşılaştırıldığında SPPV gen dizilimlerinin *ApoI (XapI)* restriksiyon enzimi kesime uğradığı fakat aynı kesim bölgesinin GTPV gen dizilimlerinde bulunmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla varlığı tespit edilen koyun-keçi çiçeği virüslerinin ayrımı amacıyla PZR ürünleri *ApoI (XapI)* restriksiyon enzimi ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. PZR ile koyunlarda çoğaltılan 289 bp uzunluğundaki bölgenin *XapI (ApoI)* kesiminde, tüm koyun PZR örneklerinin, beklenildiği gibi kesildiği tespit edilmiştir. Ancak, aynı çalışmada keçilerde elde edilen izolatlara ait PZR ürünlerinin de koyun izolatları gibi kesildiği kaydedilmiştir. Öncelikle bu sonucun *XapI (ApoI)* enzim kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Aynı şekilde Pendik Araştırma Enstitüsünden temin edilen iki keçi izolatının aynı enzimle beklenildiği gibi kesilmemesi sınırlı sayıda örnek olmasına rağmen kullanılan PZR-RFLP yönteminin SPPV ve GTPV ayırımında kullanılabilceğini ortaya koymuştur. Ancak, PZR-RFLP sonuçlarından emin olabilmek için daha güvenilir bir yaklaşım olarak iki virüs türünün ayırımına imkan sağlayan gen kısmının dizilenmesi ve dizilimlerin kıyaslanması teze dahil edilmiştir.

Koyun-keçi virüslerinin tam genomu veya kısmi dizilimlerinin kıyaslandığı çalışmalar bulunmaktadır (77, 118, 134). Tulman ve ark. (134) koyun-keçi çiçeği genomlarının tam genom analizlerinde SPPV ve GTPV’de nükleotit düzeyinde % 96 benzerlik belirlemişlerdir. Dizilimi yapılan genlerin 101’inde % 96-100, 39’unda % 91-95 ve 7’sinde 80-90 oranında aminoasit

düzeyinde benzerlikler gösterdiği kaydedilmiştir. Hosamani ve ark. (77), Capripoxvirus P32 gen bölgesinin dizilim sonuçlarının yüksek oranda benzerlikler gösterdiğini, fakat GTPV ve LSDV'nin SPPV'den farklı olarak kodonun 55. bölgesinde delesyonlar içerdiğini belirlemişlerdir. Bu nedenle P32 gen bölgesinin filogenetik değerlendirmesinde SPPV, LSDV ve GTPV'nin ayırımında kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Pathriban ve ark. (118), Hindistan'ın Tamil Nadu bölgesinde ortaya çıkan iki koyun çiçeği şüpheli salgından elde edilen 22 izolat ile koyun ve keçileri birlikte etkileyen bir izolatın viral zarf proteinin dizilim sonuçlarının karşılaştırılmasında SPPV izolatlarının kendi arasında % 96-100, SPPV izolatları ile GTPV izolatları arasında ise % 92-95 nükleotit ve aminoasit düzeyinde benzerlik olduğunu belirtmişlerdir. Le Goff ve ark. (98), 2009 yılında yaptıkları çalışmada SPPV ve GTPV genomlarında konakçı çeşitliliğini belirleyen G protein-Coupled chemokine receptor (GPCR) geninin spesifik primerlerle çoğaltılarak dizileme sonuçlarını karşılaştırdıklarında capripoxvirus izolatlarının filogenetik olarak üç farklı grup oluşturduklarını ve oluşan bu grupların etkenin izole edildiği hayvanlarla göre yapılan isimlendirme ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir. Mevcut tezde Perlprimer V1.18 programı (105) kullanılarak tarafımızdan dizayn edilen primerler kullanılarak SPPV ve GTPV genomunun terminal kısımları PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünlerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. İzolatlarımıza ait genomun terminal kısmının dizilim sonuçları capripoxviruslara ait gen bankasında bulunan mevcut dizilimleri ile Mega4 programı kullanılarak ClustalW1.6 parametreleri ile çoklu hizalamaya tabi tutulmuştur (132). Yapılan bu çalışma neticesinde çalışma kapsamında elde edilen izolatlar ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde elde edilen

izolatlara ait dizilimlerin genbankasında yer alan SPPV dizimleri ile % 99,5 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Keçi izolatu olduğu bilinen ve Pendik Araştırma enstitüsünde temin edilen iki izolat ve İran Koyun-keçi çiçeği aşı suşu olarak bilinen izolatların ise % 99,6 oranında GTPV genomları ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. SPPV ve GTPV arasında ise % 96 oranında benzerliğin olduğu, aradaki farklılığın ise daha çok GTPV dizimlerinde bulunan fakat SPPV dizimlerinde 912. ve 969. pozisyonlar arasındaki nükleotitlerin bulunmamasından kaynaklanığı belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada elde edilen tüm izolatların koyun izolatu olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, elde edilen bu bulguyla SPPV'nin keçileri enfekte edebileceği ve dolayısı ile virüsün enfekte ettiği hayvan türüne göre virüs türünün bildirilmesinin doğru olmayacağı bir kez daha görülmüştür.

Gerçekleştirilen bu tezin verileri ışığında, koyun-keçi çiçeği hastalığının çalışmanın yapıldığı bölgede endemik görüldüğü, bu hastalığa sebep olan tüm izolatların koyun kaynaklı olduğu, hastalığın özellikle kuzu ve oğlaklarda önemli morbitite ile mortaliteye yol açtığı kaydedilmiştir. Bu sonuçlara göre, hastalığın önüne geçilebilmesi için özellikle doğumdan sonraki ilk iki ayda maternal antikor varlığının sağlanması amacıyla her yıl düzenli aşılama programları yapılmasını ve genç hayvanların da üçüncü aydan itibaren aşılama programlarına dahil edilmesini önermekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Abbas Mohammed Ahmed, Mukhtar MM, ElHussein AM, Nour TAM, Fadol MA. (2007) Immune response of sheep vaccinated with capripox vaccine. *Vet Res* 1: 12-16.
2. Abbas Mohammed Ahmed, Mukhtar MM, ElHussein AM, Nour TAM, Fadol MA. (2007). Combined Antrax and sheeppox vaccine, production and immunization trial in Sudan. *J Anim Vet Adv* 6: 517-521.
3. Abdussalam M. (1957). Elementary bodies of sheep pox. *Am J Vet Res* 18: 614-617.
4. Abu-Elzein, E, Housawi F, Ramadan O, Gameel A, Al-Afaleq A, Al-Gundi O. (2003). Observations on natural and experimental infection of sheep and goats with a virulens field Capripoxvirus with affinity to goats. *Vet Arhiv* 73: 119-131.
5. Abu-Elzein EME, Housawi FMT, Al-Afaleq AI, İbrahim AO. (2004). Protection of goats, with a sheeppox vaccine, against a virulent field Capripoxvirus with high affinity to goats. *Sci J King Faisal Uni* 5: 263-274.
6. Achour HA, Bouguedour R, Bouhbal A, Guechtouli A, Aouissat M.(2000). Comparative study of the immunizing ability of some attenuated strains of sheep pox virus and of a sensitizing vaccine. *Rev Sci Tech* 19: 773-783.
7. Adlaka SC, Bansal MP, Malik BS.(1971). Studies on sheep and goatpox viruses. adaptation of the viruses in laboratory animals and tissue culture. *Indian J Anim Sci* 41: 171-175.
8. Afshar A, Bundza A, Myers DJ, Dulac GC, Thomas FC. (1986). Sheep Pox: Experimental Studies with a West African Isolate. *Can Vet J* 27 : 301-306.
9. Ahmed AM, Mukhtar MM, ElHussein AM, Nour TAM, Fadol MA. (2007). Immune responses of sheep vaccinated with combined Antrax and Capripox vaccine. *Res J Anim Sci* 1: 49-52.
10. Altinel C, Özyörük F, Uyanık F.(1993). Kuzu testis hücre kültüründe prototip koyun-keçi çiçek aşısının üretilmesi üzerine çalışmalar. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 24: 47-55.
11. Al Dubaib M.( 2005). A highly disfiguring sheep pox outbreak. *Egyptian J Virol* 2: 51-60.
12. Anonim. Sheep and Goat pox. OIE Terrestrial Manual ([http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm)). Erişim tarihi: 30.01.2010.
13. Anonim. Disease distribiton maps. [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_status\\_map](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map). Erişim tarihi: 30.01.2010
14. Anonim. Detailed country(ies) disease incidence. ([http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_status\\_detail](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_detail)). Erişim tarihi: 30.01.2010
15. Anonim. İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları. ([http://www.kkkgm.gov.tr/birim/hay\\_sagl/ihb\\_mec\\_hast.html](http://www.kkkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/ihb_mec_hast.html)). Erişim tarihi: 30.07.2009.
16. Anonim. Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Yönetmeliği. (<http://www.kkkgm.gov.tr/yonetmelik/3285y.html>). Erişim tarihi: 30.07.2009.

17. Anonim. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Penpox-M Koyun ve keçi çiçek aşısı. (<http://www.penvet.gov.tr/urunler.asp?res=ana&id=437#>). Erişim tarihi: 30.01.2010.
18. Anonim. Dollvet Poxdoll Canlı Koyun-keçi çiçek aşısı. (<http://www.dollvet.com.tr/poxdoll.html>). Erişim tarihi: 30.01.2010.
19. Anonim. Vetal Poxvac Koyun keçi çiçek aşısı. (<http://www.veral.com.tr/poxvac.htm>). Erişim tarihi: 30.01.2010.
20. Anonim. Intracellular mature virus; IMV and extra cellular enveloped virus; EEV. ([http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/152.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/152.html).) Erişim tarihi: 30.01.2010.
21. Arda M. (1994). Biyoteknoloji: Bazı Temel İlkeler. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. No: 2 İkinci Baskı.
22. Arık F. (1968). Koyun çiçeği ve ektima viruları arasında kros bağışıklık üzerine çalışmalar. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 3: 63-65.
23. Arık F, Kurtul Y. (1970). Koyun ve keçi çiçek virusları arasındaki kros bağışıklık üzerine çalışmalar. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 2: 7-12.
24. Arık F, Kurtul Y. (1973). Koyun çiçeği virusunun değişik koyun ırklarında Borrel metoduyla üretilmesi ve titrasyonu. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 6: 79-90.
25. Arık F, Kurtul Y. (1974). Koyun çiçek virusunun canlı embriyolu tavuk yumurtasında üretilmesi üzerine çalışmalar. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 1:20-24
26. Arık F, Bingöl M. (1979). Liyofilize koyun çiçek aşısının hazırlanması üzerine araştırma. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 1: 41-60.
27. Babiuk S, Parkyn Geoff, Copps J, Larence JE, Sabara MI, Bowden TR, Boyle DB, Kitching RP. ( 2007). Evaluation of an ovine testis cell line (OA3,Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immuno staining technique for plaque visualisation. J Vet Diagn Invest 19: 486-491.
28. Babiuk S, Bowden TR, Boyle D B, Wallace DB, Kitching RP. (2008). Capripoxviruses: An Emerging Worldwide Threat to Sheep, Goats and Cattle. Transbound Emerg Dis 55: 263-272.
29. Batta MK, Katoch RC, Sharma M, Joshi VB, Nagal KB. (1999). Epidemiological observation on goat pox in Himachal Pradesh. Indian Vet J 76: 683-684.
30. Balamurugan V, Jayappa KD, Hosmani M, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Kumar RK. (2009). Comparative efficacy of conventional and Taqman polymerase chain reaction assays in the detection of capripoxviruses from clinical samples. J Vet Diagn Invest 21: 225-231.
31. Balinsky CA, Delhon G, Smoliga G, Prarat M, French RA, Geary SJ, Rock DL, Rodriguez LL. (2008). Rapid and Preclinical detection of sheeppox virus by a Real-Time PCR assay. J Clin Microbiol 46: 438-442.
32. Bazin H. (2003). A brief history of prevention of infectious diseases by immunisations. Comp. Immun. Microbiol Infect Dis 26: 293-308.

33. Beard PM, Sugar S, Bazarragchaa E, Gerelmaa U, Tserendorj S, Tuppurainen E, Sodnomdarjaa.( 2009). A description of two outbreaks of capripoxvirus disease in Mongolia. *Vet Microbiol* (Baskıda).
34. Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, Libeau G, Fleming M, Black DN, and Diallo A. (2003). Development of a Dual Recombinant Vaccine To Protect Small Ruminants against Peste-des-Petits-Ruminants Virus and Capripoxvirus Infections. *J Virol* 77: 1571-1577.
35. Belwal M, Nivsarkar AE, Mathur PB, Singh RN. (1982). Epidemiology of sheep pox. *Trop Anim Health Prod* 14: 229-233.
36. Bhanuprakash V, Indrani, Hedge R, Kumar MM, Moorthy ARS. (2004). A classical live attenuated vaccine for sheep pox. *Trop Anim Health Prod* 36: 307-320.
37. Bhanuprakash V, Indrani, BK, Hosamani, M, Singh RK. (2005). The current status of sheep pox disease. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 29: 27-60.
38. Bhanuprakash V, Hosamani, M, Balamurugan V, Gandhale P, Naresh R, Swarup D, Singh RK. (2008). In vitro antiviral activity of plants on goatpox viral replication. *Indian J Ex Biol* 46: 120-127.
39. Bhat PP, Mishra BP (1989). Restriction enzyme profiles as molecular epidemiological tools for characterizing sheep pox virus genomes. *Indian J Anim Sci* 59: 1475-1490.
40. Bhat PP, Bhat PN, Mishra BP, Kumar S, Singh RK. (1993). A comparison of the genomes of goat, sheep and buffalo pox virus isolates. *Indian J Anim Sci* 63: 1075-1078.
41. Black DN, Hammond JM, Kitching RP. (1986). Genomic relationship between capripoxviruses. *Virus Res* 5: 277-292.
42. Bhatnagar A, Gupta BM.(1974). Affinity of sheep poxvirus (SP<sub>8</sub> strain) for heterologus system. *Curr Sci* 43: 254–255.
43. Bowden TR, Babiuk SL, Parkyn GR, Copps JS, Boyle DB. (2007). Capripoxvirus tissue tropism and shedding: Aquantitive study in experimentallty infected sheep and goats. *Virology* 371:380-393.
44. Buller RML, Palumbo GJ. (1991). Poxvirus Pathogenesis. *Microbial Rev* 55: 80-122.
45. Buller RML, Moyer YW, Esposito JJ, Arif BM, Black DN, Dumbell K, Lefkowitz EJ, McFadden G, Mercer A, Moss B, Skinner MA, Tripathy DN, Wittek R (2005). Family Poxviridae. "Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the. International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego. Sayfa: 117-133.
46. Carn VM (1993). Control of capripoxvirus infections. *Vaccine* 11: 1275-1279.
47. Carn VM, Kitching RP, Hammond JM, Chand P.(1994). Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripox virus. *J Virol Methods* 49: 285–294.
48. Carn VM.(1995). An antigenic trapping ELISA for the detection of capripox virus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *J Virol Methods* 51: 95–102.

49. Chaudhary SS, Pandey KD, Singh RP, Verma PC, Gupta PK. (2009). A vero cell derived combined vaccine against sheep pox and Peste des Petits ruminants for sheep. *Vaccine* 27: 2548-2553.
50. Chaturvedi GC, Kalra SK, Prasad S. (1983) T and B cell population in sheep immunized with inactivated sheep pox vaccine. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis* 4: 183–186.
51. Chauveau A. (1868). (i) Theorie de la contagion miasmatische ou mediate appelee encore infection. (ii) Theorie de la contagion mediate ou miasmatische, *Cerahebd Seanc Acad Sci Paris*. 67: 746–753.
52. Cheng Z, Yue J, Li Y, Xu L, Wang K, Zhou B, Chen J, Li J, Jiang N. (2009). Development and application of TaqMan-MGB real-time quantitative PCR assay for detection of goat pox virus. *Chinese J Bitotech* 25: 464-72.
53. Çeliker A, Arık F. (1968). Koyun çiçeği virüsünün fiziksel karakterleri üzerine çalışmalar. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 3: 66-69.
54. Daoud AH (1997). Sheep pox among Australian sheep in Jordan. *Trop Anim Health Prod* 29: 251–252.
55. Davies FG. (1976). Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goats in Kenya with observations on the epidemiology and control. *J Hyg* 76: 163–171.
56. Davies FG, Otema C. (1981). Relationship of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. *Res Vet Sci* 31: 253–255.
57. Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M. (2002). Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann NY Acad Sci* 969: 88–91.
58. Diallo A, Viljoen GJ. (2008). Genus Capripoxvirus. “Poxviruses”. Mercer A, Schmidt, Weber O (Editörler) . Birkhauser, Basel, İsviçre. Sayfa: 167-181.
59. Diallo A, Viljoen GJ. (2008). Origin and Evolution of Poxviruses. “Origin and Evolution of Viruses: Second Edition” .Domingo E, Parrish CR, Holland JJ. (Editörler), Academic Press. Sayfa: 431-446.
60. Dubey SC, Sharma MM, Sharma SC (1982). Studies on outbreak of sheep pox in South Eastern part of Rajasthan, India. *Vet Med J* 6: 91–93.
61. Ergin H, Köklü A, Onar B. (1988). Keçi çiçeğine karşı kuzu böbrek hücre kültürlerinde aşı hazırlanması ve aşının keçilerde bağışıklık denemeleri. *Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg* 1: 60-65.
62. Ergin H, Onar B. (1989). Kuzu böbrek hücre kültürlerinde attenüe koyun çiçek aşı suşu ile patojen saha virusunu ortaya çıkaracak bir metodun bulunması. *Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg* 1: 51-56.
63. Erhan M, Ergin H, Onar B. (1979). Liyofilize Koyun çiçek aşısı ile aşılanan koyunlarda meydana gelen bağışıklığın değerlendirilmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg* 2: 17-38.

64. Eröksüz Y, Bulut H, Gülaçtı İ, Çaribaşı AO (2008). Seasonal distribution of sheeppox cases in lambs in Eastern Turkey. *J Anim Vet Adv* 7: 638-642.
65. Frey HR, Liess B. (1971). Vermehrungskinetik und verwendbarkeit einer stark cythopathogenen VD-MD virusstammes für diagnostische untersuchugen mit der mikrotiter method. *Zbl Vet Med B* 18: 61-71.
66. Fulzele S, Singh RK, Hosamani M, Mondal B, Yadav MP. (2006).Evaluation of duplex PCR and PCR-RFLP for diagnosis of sheep and goat pox. *Intl J Trop Med* 1: 66-70.
67. Garner MG, Sawarkar SD, Brett EK, Edwards JR, Kulkarni VB, Boyle DB, Singh SN. (2000). The Extent and Impact of Sheep Pox and Goat Pox in theState of Maharashtra, *Indian Trop Anim Hlth Prod* 32: 205-223.
68. Gershon PD, Black DN (1988). A comparison of the genomes of capripoxvirus isolates of sheep, goats and cattle. *Virology* 164: 341-349.
69. Gershon PD, Kitching RP, Hammond JM, Black DN. (1989). Poxvirus genetic recombination during natural transmission. *J Gen Virol* 70: 485-489.
70. Gershon PD, Ansell DM, Black DN. (1989). A comparison and the genome organisation of capripoxviruses with that of Orthopoxvirüses. *J Virol* 63: 4703-4708.
71. Gershon, PD, Black DN. (1989). A capripoxvirus pseudogene whose only intact homologs are in other poxvirus genomes. *Virol J* 172:350-354.
72. Greth A, Goureau JM, Vassart M, Nguyen-Ba-Vy, Wyerss M, Lefevre PC. (1992). Capripoxvirus disease in Arabian oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia. *J Wildl Dis* 28: 295–300.
73. Gubser C, Hue S, Kelam P, Smith GL. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85: 105-117.
74. Gülbahar MY, Çabalar M, Gül Y, İçen H. (2000). Immunohistamical detection of antigen in lamb tissues naturally infected with sheeppox virus. *J Vet Med* 47: 173-181.
75. Gülbahar MY, Davis WC, Yüksel H, Çabalar M.(2006). Immunohistochemical evaluation of Inflammatory infiltrate in the skin and lung of lambs naturally infected with sheeppox virus. *Vet Pathol* 43: 67–75.
76. Heine HG, Stevens MP. Ford AJ, Boyle DB. (1999). A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the antigen P32, the homolog of the vaccinia virüs H3L gene. *J Immunol Methods* 227:187-196.
77. Hosamani M, Mondal B, Tembhrne PA, Bandyopadhyay SK, Singh RK, Rasool TJ. (2004). Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus Genes* 29: 73-80.
78. Hosamani M, Bhanuprakash V, Kallesh DJ, Balamurugan V, Pande A, Singh RK. (2008). Cell culture adapted sheeppox virus as a chalange virus for potency testing of sheeppox vaccine. *Indian J Exp Biol* 46:685-689.
79. Hughes AL, Friedman R (2005). Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol Phylogenet Evol* 35: 186-195.

80. Hutyra F, Marek J, Manninger R. (1946). *Special Pathology and Therapeutics of the Diseases of Domestic Animals*, Bailliere, Tindall and Cox, London. Sayfa: 353–366.
81. Ireland, DC, Binopal YS, (1998) Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods* 74: 1-7.
82. Johnston JB, Mcfadden G.(2003). Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol* 77: 6093-6100.
83. Joshi RK, Chandra R, Rao VDP, Garg SK. (1994). Growth and cytopathogenicity of goat pox virus. *Indian J Comp Microbiol Immun Infect Dis* 15: 35-36.
84. Kadyrov RA.( 1975). Combined immunization of sheep against antrax, sheep pox and clostridial infections. *Vet Moscow* 2: 50-2.
85. Karber G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reinhenversuche. *Ach Exp Pathol Pharmakol* 162: 480-483.
86. Kitching RP, Taylor WP. (1985). Transmission of capripox virus. *Res Vet Sci* 39: 196–199.
87. Kitching RP, Taylor WP. (1985). Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goatpox viruses. *Trop Anim Health Prod* 17: 64–74.
88. Kitching RP, Smale C. (1986) Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res Vet Sci* 41: 425–427.
89. Kitching RP, Bhat PP, Black DN. (1989) The characterization of African strains of capripoxvirus. *Epidem Inf.* 102:335-343.
90. Kitching RP. (2003). Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev Biol* 114: 161–167.
91. Kitching RP. (2007) Sheep pox. “ *Diseases of Sheep, 4th Edition*” Aitken I.D. (Editör). Blackwell Publishing. Sayfa: 302-306.
92. Kitching RP. (2008) Capripoxviruses. “ *Encyclopedia Of Virology: 3rd Edition*” . Academic Pres Ltd. Sayfa: 427-432.
93. Köklü A. (1972). Koyun yünlerinin patojen koyun çiçek viruslarına etkileri üzerine yapılan araştırmalar. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 1: 43-47.
94. Köylü A, Nitzschke E. (1968) Characteristics of sheep and goat pox viruses from Turkey. I. Studies on thermo- stability. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 1: 57-60.
95. Köylü A, Nada SM. (1970). Koyun embriyo deri kültürlerinde koyun çiçek virüsünün üretilmesi. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 1: 88-89.
96. Kusiluka L, Kambarage D. (1996). Goat and sheep and pox. “*Diseases of Small Ruminants in Sub Saharan Africa: A Handbook*” Vetaid, Scotland. Sayfa:70-72.
97. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. (2006). Poxviruses: past, present and future. *Virus Res* 117:105–118.
98. Le Goff C, Lamien CE, Fakhfakh E, Chadeyras A, Aba-Adulugba, Libeau G, Tuppurainen E, Wallace DB, Adam T, Silber R, Gulyaz V, Madani H, Caufour P, Hammami S, Diallo

- A, Albina E. (2009). Capripoxvirus G-protein-coupled chemokine receptor: a host range gene suitable for virus animal discrimination. *J Gen Virol* 90: 1967-1977.
99. Mangana-Vougiouka O, Markoulatos P, Koptopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O. (1999). Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J Virol Meth* 77: 75-79.
  100. Mangana-Vougiouka O, Markoulatos P, Koptopoulos, G, Nomikou K., Bakandritsos, N., Papadopoulos, O. (2000) Sheep pox virus identification from clinical specimens by PCR, cell culture, immunofluorescence and agar gel immunoprecipitation assay. *Mol Cell Probes* 14: 305-310.
  101. Mangana O, Kottaridi C, Nomikou K. (2008). The epidemiology of sheep pox in Greece from 1987 to 2007. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 27: 899-905.
  102. Mariner JC, House JA, Wilson TM, Van Den Ende M, Diallo I. (1991). Isolation of Sheep pox virus from lamb in Niger. *Trop Anim Health Prod* 23: 27-28.
  103. Mark R, Buller B, Palumbo GJ (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55: 80-122.
  104. Markoulatos P, Mangana-Vougiouka O, Koptopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O. (2000) Detection of sheep pox virus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 84: 161-167.
  105. Marshall OJ. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20: 2471-2472.
  106. Martin WB, Erhan B, Onar B. (1975). Koyun çiçeği aşısı üzerine çalışmalar, serum-virüs nöralizasyon testleri. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 1: 26-47.
  107. Martrenchar A, Zoyem N, Diallo A. (1996). Experimental study of a mixed vaccine against peste des petits ruminants and capripox infection in goats in northern Cameroon. *Small Rum Res* 26: 39-44.
  108. Mishra KC, Singh MP. (1984). Study on an outbreak of sheep pox in an experimental flock of Bikaneri rams. *Indian J Anim Health* 6: 99-101.
  109. Mondal B, Hosamani M, Dutta TK, Senthilkumar VS, Rathore R, Singh RK. (2004). An outbreak of sheep pox on sheep breeding farm in Jamnu, India. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 23: 943-949.
  110. Munz EK, Owen NC. (1966). Electron microscopic studies on lumpy skin disease virus type Neethling. *Onderstepoort J Vet Res* 33: 3-8.
  111. Murray M, Martin WB, Köylü A. (1974). Deneysel koyun çiçeği üzerinde histolojik ve elektromikroskopik bir çalışma. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 2: 204-213.
  112. Oğuzoğlu TÇ, Alkan F, Özkul A, Atalay Vural S, Güngör AB, Burgu, I. (2006) A sheep pox virus outbreak in central Turkey in 2003: Isolation and identification of Capripoxvirus Ovis. *Vet Res Comm* 30: 965-971.
  113. Olive M, Bean P. (1999). Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 37: 1661-1669.

114. Onar B. (1972). Türkiye'deki koyun keçi çiçeği virüs suşlarının embriyolu tavuk yumurtasında üretilmesi üzerine çalışmalar. *Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg* 1: 48-51.
115. Onar B, Altinel C, Alp AA. (1990). Liyofilize koyun-keçi çiçek aşısında koruyucu olarak kullanılan lactalbumin hidrolysate ve sucrose yerine süttezinin bu amaçla kullanılması çalışmaları. *Pendik Hayv Hast Merk Araşt Enst Derg* 1: 35-40.
116. Orlova ES, Scherbakov AV, Diev VI, Zakharov VM. (2006). Differentiation of capripoxvirus species and strains by polymerase chain reaction. *Mol Biol (Mosk)*. 40: 158-64.
117. Özmen Ö, Kale M, Haligür M, Yavru S. (2009). Pathological, serological and virological findings in sheep infected simultaneously with Bluetongue, Peste-des-petits-ruminants and sheep pox viruses. *Trop Anim Health Prod* 41: 951-958.
118. Pathriban M, Govindarajan R, Purushothaman V, Daniel Joy Chandran N, Koteeswarn A. (2005). Comparative sequence analysis of diagnostic PCR amplicons from Indian sheep pox virus. *Vet Arhiv* 75: 203-209.
119. Perenlei L, Solyom F.(1983). Study of the duration of immunity against sheep pox with a live virus vaccine. *Acta Vet Hung* 31: 131-134.
120. Plowright W, Ferris RD. (1958). The growth and cytopathogenicity of sheep pox virus in tissue culture. *Br J Exp Pathol* 38: 424-435.
121. Precausta P, Kota F, Vellut G. (1979). A new freeze-dried living virus vaccine against sheep pox. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1: 305-319.
122. Rao TVS, Negi BS, Bansal MP. (1997) Isolation and characterization of soluble antigens of sheep pox virus. *Indian J Exp Biol* 35: 597-602.
123. Rao TVS, Bandyopadhyay SK. (2000). A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis. *Anim Health Res Rev* 1: 127-136.
124. Roy P, Purushothaman V, Sreekumar C, Tamizharasan S, Chandramohan A. (2008). Sheep pox disease outbreaks in Madras Red and Mechery breeds of indigenous sheep in Tamilnadu, India. *Res Vet Sci* 85: 617-621.
125. Senthilkumar V, Thrunavukkarasu M, Kathiravan G. (2006). Survival time in sheep affected by sheep pox and enterotoxaemia. *J Anim Vet Adv* 5: 647-650.
126. Simmonds JB.(1848). *Variola Ovina or Small Pox in Sheep*. London.
127. Singh IP, Pandey R, Srivastava RN. (1979). Sheep pox: A review. *Vet. Bull.* 49: 145-154.
128. Smith GL, Beard P, Skinner MA. (2008). Poxviruses. " *Encyclopedia of Virology: 3rd Edition*". Academic Press Ltd. Sayfa: 322-330.
129. Stram Y, Kuznetsova L, Friedgut O, Gelman B, Yadin H, Rubinstein-Guini M. (2008). The use of lumpy skin disease virus genome for detection and phylogenetic analysis. *J Virol Methods* 151: 225-229.
130. Solyom F, Perenlei F, Roith J.(1980) . A live attenuated virus vaccine against sheep pox. *Acta Vet Acad Sci Hung* 28: 389-398.

131. Solyom F, Perenlei F, Roith J. (1982). Sheep pox vaccine prepared from formaldehyde inactivated virus adsorbed to aluminium hydroxide gel. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 29: 69–75.
132. 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.
133. Toth A (1937). An outbreak of sheep pox. *Allatorv Lapok* 60: 151–152.
134. Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur JH, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. (2002). The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *J Virol* 76: 6054-6061.
135. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR (2005). The Detection of Lumpy skin disease virus using a PCR assay “Molecular Diagnostic PCR Handbook” Springer, Dordrecht, The Netherlands. Sayfa: 195-201.
136. Yashpal M, Mahesh K, Batra SK, Puranchand, Malik Y, Khatri (1997). Occurrence of sheep pox in unorganized flocks in Haryana State, India. *J Anim Sci* 67: 962–963.
137. Yazıcı Z, Oguzoglu TÇ, Okur-Gumusova S. (2008). Detection and phylogenetic analysis of local capripoxvirus from necropsy specimens of sheep suspected of sheeppox infection. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77: 97-100.
138. Yeruham I, Yadin H, Van Ham M, Bumbarov V, Soham A, Perl S. (2007). Economic and epidemiologic aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet Rec* 160: 236-237.
139. Woldemeskel M, Ashenafi H (2003). Study on skin diseases in sheep from northern Ethiopia. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 110: 20-22.
140. Zheng M, Liu Q, Jin N, Guo J, Huang X, Li H, Zhu W, Xiong Y. (2007). A duplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Capripoxvirus and Orf Virus. *Mol Cell Probes* 21: 276-281.
141. Zhou JS, Ma HL, Guo S. (2004). Culturing of ovine testicular cells and observation of pathological changes of the cell inoculated with attenuated sheep pox virus. *Chinese J Vet Sci Technol* 37: 71-74.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Afyonkarahisar ilinin Çay ilçesinde 1979 yılında doğdum. İlk ve orta öğrenimi Afyonkarahisar'da, lise öğrenimimi Manisa'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni 1998 yılında kazandım ve 2004 yılında mezun oldum. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Programı Viroloji Anabilim Dalında 2004 yılında doktora eğitimime başladım. Halen Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde Viroloji Laboratuvar Şefi olarak görev yapmaktayım. Evli ve iki çocuk babasıyım.