



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KEÇİLERDE CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS
VIRUS (CAEV) ENFEKSİYONUNUN KAN VE SÜT
ÖRNEKLERİNDE ELISA VE PCR TEKNİKLERİ İLE
TANISI VE YEREL VİRUSLARIN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Zeynep BAŞARAN KARAPINAR

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim BURGU**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEÇİLERDE CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS
VIRUS (CAEV) ENFEKSİYONUNUN KAN VE SÜT
ÖRNEKLERİNDE ELISA VE PCR TEKNİKLERİ İLE
TANISI VE YEREL VİRUSLARIN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Zeynep BAŞARAN KARAPINAR

VİROLOJİ ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN
İbrahim BURGU**

2010 - ANKARA

KABUL VE ONAY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1. 1. Etiyoloji	2
1.1.1. CAE Virusunun Morfolojisi ve Genomik Yapısı	5
1.1.2. CAE Virusunun Replikasyonu	7
1.2. Epidemiyoloji	8
1.3. Klinik Bulgular	9
1.4. Patogenez	10
1.5. Teşhis	12
1.6. Mücadele ve Korunma	13
1.7. Bağışıklık	14
1.8. CAEV Enfeksiyonunun Dünyadaki ve Türkiye’ deki Durumu	15
1.9. Tezin Amacı	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1.Gereç	18
2.1.1. Tanı Materyalleri	18
2.1.1.1 Kan ve Süt Serumı Örnekleri	18
2.1.1.2.Virus Nükleik Asiti Tespiti Amacıyla Kullanılan Materyaller	19
2.1.2. ELISA Kiti	19
2.1.3. Nested PCR ve Klonlama Kitleri	20

2.2.Yöntem	21
2.2.1.Serolojik Çalışma	21
2.2.1.1. Kan Serumu Örneklerinin Hazırlanması	21
2.2.1.2. Süt Serumu Örneklerinin Hazırlanması	21
2.2.1.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay	21
2.2.2. Virolojik Çalışma	22
2.2.2.1.Virus Nükleik Asit Tespiti için Kullanılan Materyallerin Hazırlanması	22
2.2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması	22
2.2.2.1.2. Süt Örneklerinin Hazırlanması	22
2.2.2.1.3. DNA Ekstraksiyonu	23
2.2.2.1.4. Nested PCR Ürün Eldesi	23
2.2.2.1.5. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi	25
2.2.2.1.6. CAEV Pozitif PCR Ürünlerinin Klonlanması	25
2.2.2.1.7. Dizin Analizi	26
2.2.2.1.8. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	27
3. BULGULAR	28
3.1. Serolojik Çalışma	28
3.1.1. ELISA Sonuçları	28
3.2. Virolojik Çalışma	29
3.2.1. Nested PCR Testi Sonuçları	29
3.2.2. Dizin Analizi Sonuçları	32
4.TARTIŞMA	41
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
EK-1. Araştırmada elde edilen CAE viruslarının gag geni dizinleri	59
ÖZGEÇMİŞ	61

ÖNSÖZ

Keçilerin Caprine Arthritis Encephalitis Virus Enfeksiyonu (CAEV); bütün dünya ülkelerinde yaygın olan, uzun inkubasyon periyoduna sahip, yavaş ilerleyen persiste kronik bir hastalıktır. Enfekte keçi sütüyle anneden yavruya nakledilebildiğinden özellikle sütçü keçi ırklarında büyük ölçüde verim kaybına neden olmaktadır. Bu durum, son yıllarda tüketimi artmış olan ve gittikçe önem kazanan keçi sütü üretimi alanında oldukça önemlidir.

Dünyada keçi ihracatında önemli olan CAEV enfeksiyonunu engelleyebilmek için Amerika'da ve pek çok Avrupa ülkesinde kontrol ve mücadele programları uygulanmaktadır. Ülkemizde varlığı daha önce serolojik araştırmalarla ortaya konan enfeksiyonunun prevalansına ilişkin güncel verilerin elde edilmesi, ELISA ve PCR teknikleri kullanılarak yapılan incelemelerde kan ve süt örneklerinin tanı materyali olarak değerlendirilmesi ile yerel suşlarının genetik karakterizasyonunun yapılması amaçlanan bu çalışma ile hastalığın önemi ifade edilmiş olup, ileride yapılması planlanan benzeri çalışmalara ve mücadele programlarına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı' nın tüm imkanlarından faydalanmamı sağlayan Danışman Hocam Sayın Prof.Dr.İbrahim BURGU'ya, tez izleme komitesi çalışmalarında olumlu yönlendirmeleri ile katkıda bulunan Sayın Prof.Dr. Yılmaz AKÇA ve Prof.Dr. Hakan YARDIMCI' ya, daima motive edici yaklaşımı ile gösterdiği sabır ve yardımları için Prof.Dr. Feray ALKAN'a, yapıcı eleştirileri ve katkıları için Prof.Dr. Aykut ÖZKUL'a, yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Doç.Dr. M. Taner KARAOĞLU, Doç.Dr.T.Çiğdem OĞUZOĞLU' na, çalışmam boyunca birlikte dayanışma içinde görev yaptığım araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, tez çalışmama büyük katkıları bulunan Prof. Dr. Yahia Chebloune'a, destek ve anlayışları için aileme, sabır ve teşvikleri ile daima yanımda olan eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	: Agar Gel İmmuno Diffüzyon
Bp	: Baz pair
CAEV	: Caprine Arthritis Encephalitis Virus
°C	: Centigrad
CPE	: Cytopathic effect
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
d NTP	: Deoksi nukleotid tri phosphate
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
FDS	: Fötal dana serumu
GSM	: Goat Synovial Membran
Kd	: Kilodalton
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
MVV	: Maedi Visna Virus
OD	: Optical dansite
OIE	: Office International des Epizooties
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribo nükleik asit
SRLV	: Small Ruminant Lentiviruses
Taq	: Thermus aquaticus

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. CAE virusunun morfolojik ve genetik yapısı	6
Şekil 1.2. CAE virusunun replikasyonu	8
Şekil 3.1. Nested PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü	30
Şekil 3.2. Analiz edilen CAEV dizinlerinin kendi aralarında çoklu hizalanması	33
Şekil 3.3. CAEV saha virusları gag gen bölgesi dizinlerinin referans dizinler ile karşılaştırılması	36
Şekil 3.4. Çalışmada elde edilen CAEV gag geni dizinlerinin Gen Bankasından sağlanan SRLV dizinleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik harita	39
Şekil 3.5. Araştırmada elde edilen kısmi CAEV-gag geni dizinlerinin kendi aralarında aminoasit düzeyinde çoklu hizalanmaları	40

ÇİZELGELER

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Retrovirusların sınıflandırılması	4
Çizelge 2.1. Araştırmada kullanılan tanı materyallerine ait veriler	19
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ve genom lokalizasyonları	20
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan PCR karışım bileşenleri ve miktarları	24
Çizelge 2.4. Dizin analizi çalışmalarında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları	27
Çizelge 3.1. Kan ve Süt Örneklerinin ELISA sonuçları	28
Çizelge 3.2. Kan ve süt örneklerinin ELISA sonuçlarının karşılaştırılması	29
Çizelge 3.3. Kan ve süt örneklerinin PCR sonuçları	31
Çizelge 3.4. ELISA ve PCR sonuçlarının karşılaştırılması	31
Çizelge 3.5. Araştırmada elde edilen kısmi CAEV-gag nükleotid dizinlerinin adı (orijini) ve Gen Bankası kayıt numaraları	32
Çizelge 3.6. Gen Bankasından sağlanan referans virusların orijinleri ve Gen Bankası Kayıt numaraları	35

1. GİRİŞ

Keçilerin Caprine Arthritis Encephalitis Virusu (CAEV) ve koyunların Maedi Visna Virusu (MVV) “Küçükbaş Gevişenlerin Lentivirusları” (Small Ruminant Lentivirus-SRLV) olarak adlandırılmakta olup, multisistemik inflamatorik hastalık tablosu oluşturarak süt üretiminde, doğum ağırlığında, canlı ağırlık kazancında azalma ve yüksek mortalite oranı ile büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Peterhans ve ark., 2004; Saman ve ark., 1999). Koyun ve keçilerin birlikte bulunduğu sürülerde doğal olarak söz konusu virusların her iki tür arasında (koyun-keçi) nakli meydana gelebilmektedir (Shah ve ark. 2004). Ayrıca koyun ve keçi türlerinin her ikisinin de küçükbaş gevişen lentiviruslarının bütün genotiplerini taşıyabileceği belirlenmiş olup, başarılı bir mücadele programı için yapılacak kontrollerin her iki türü de içermesi gerektiği bildirilmektedir (Gjerset ve ark., 2009, Saman ve ark.,1999). SRLV enfeksiyonları İzlanda, Yeni Zelanda ve Avustralya gibi mücadele programı uygulayan ülkelerde önemli ölçüde azaltılmıştır (Peterhans ve ark. 2004).

CAE virusu uzun inkubasyon periyoduna sahip olup, konakta subklinik olarak seyreden, ömür boyu persiste kronik enfeksiyona neden olmaktadır. Nadiren gözlenebilen en önemli klinik bulgular erişkin hayvanlarda ilerleyici ve tedavi edilemeyen poliartthritis, 2-6 aylık yaştan daha genç oğlaklarda ise demiyelinize encefalitistir. Diğer klinik belirtiler ise; mastitis, süt üretiminde azalma ile sonuçlanan “hard udder sendromu” (katı meme sendromu), ilerleyici parezis, nörolojik disfonksiyon, kronik intersitisyel pneumoni ve aşırı kilo kaybı olarak bildirilmektedir (Adams ve ark. 1983; Crawford ve ark.1980).

CAEV enfeksiyonu ilk olarak Amerika’da sinir sisteminin bir hastalığı olarak tanımlanmış ve “Keçilerin Viral Leukoencephalomyelitisi” (VLG) olarak isimlendirilmiştir (Cork ve ark., 1974). Daha sonra arthritis bulgularının da aynı

virus enfeksiyonundan kaynaklandığı belirlenmiş ve hastalığın adı CAEV enfeksiyonu olarak değiştirilmiştir (Adams ve ark.,1984) .

CAE virusun ilk izolasyonu 1980 yılında Crawford ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş olup, etken arthritis görülen keçilerin eklemelerinden çıkarılan synovial membranlardan izole edilmiştir (Cork ve ark.,1980) .

1.1. Etiyoloji

Retrovirusların keşfi ilk olarak 1908 yılında Kopenhag-Danimarka’da Vilhelm Ellermann ve Olaf Bang tarafından tümör oluşturan “Tavuk Leukemi Virus”un tavuk lökositlerinden izole edilmesi ile başlamıştır ve 1911 yılında Peyton Rous’un bu virusu “Rous Sarcoma Virus” olarak isimlendirmesi ile devam etmiştir (Rous, 1910). Adını sahip olduğu Reverse Transcriptaz enziminden alan *Retroviridae* ailesi 2 alt aileye ayrılmaktadır (Çizelge1.1). İlk 60 yıl boyunca hayvan enfeksiyonları üzerine odaklanılmış, 1960-1970 yıllarında ise virusların replikasyonu ve hücre üzerindeki patolojik etkileri konularında çalışmalar başlamıştır (Javier ve Butel, 2008). Retroviruslar gen tedavisi için değiştirilerek kullanılmış olan ilk viruslar olup, günümüzde halen bu amaçla kullanılmaktadırlar (Coffin ve ark., 1997; Wei-Shau ve Pathak, 2000).

Visna-Maedi Virus ve CAEV’in çeşitli izolatlarının nükleotid sekansı karşılaştırıldığında bu virusların yakın akraba oldukları, diğer hayvan ve insan lentivirusları ile daha az yakınlık gösterdikleri tespit edilmiştir (Granoff ve Webster, 1999; Oliver ve ark.,1984). Koyunlardan elde edilen genotiplerin CAE virusuna, keçilerden elde edilen genotiplerin ise MVV’na yakınlık gösterdiği belirlenmiş olup, bu durum bu virusların bir arada araştırılmasını gerekli kılmıştır (Chebloune ve ark., 1999c). CAEV ve MVV’nin aminoasit dizinleri karşılaştırıldığında gag ve pol genlerinde %74,5-77 oranında ilişki bulunduğu env geninde ise %80 oranında benzerlik bulunduğu belirlenmiştir. Bu iki virusun hedef olarak seçtikleri organ farklı

olmasına rağmen, hücre tropismusu ve patojenitesinin aynı olduğu belirlenmiştir (Reina ve ark., 2006).

SRLV ilk yıllarda gag geni göz önüne alınarak yapılan sınıflandırmada 6 gruba ayrılmıştır. I. grup İzlanda MVV virusunu ve ilişkili MVV suşlarını, II. grup Kuzey Amerikadaki koyunlardan izole edilmiş olan suşları, III. grup Norveç suşlarını, IV. grup Fransız SRLV suşlarını, V. grup Fransız ve İsviçre CAEV suşlarını, orijin suşunu, Kuzey Amerika ovine lentiviruslarını ve VI. grup Fransız SRLV suşlarını içerir. Bu gruplandırmada I ve II. grupta yer alan suşlar tür spesifik iken, III-VI. grupta bulunan suşlar koyun ve keçi türlerinin her ikisinde de enfeksiyon oluşturabilen suşlardır (Zanoni., 1998). Daha uzun nükleik asit sekansı temeline dayandırılıp, pol geni de kullanılarak yapılan yeni bir sınıflandırma ile SRLV suşları A, B, C, D ve E olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. A grubu 7 alt gruba, B grubu ise 2 alt gruba ayrılmaktadır. Bugüne kadar A5 ve A7 alttipleri ile C ve D grupları sadece keçilerde belirlenmiştir. A1 ve A2 koyunlardan izole edilmiştir. A3, A4, A6 ve B1, B2 alt tipleri ise her iki türden de izole edilmiştir (Shah ve ark. 2004).

Sınırlı bir coğrafik bölgede bulunan hayvanlar arasında gelişen doğal enfeksiyonlarda; koyun ve keçi lentiviruslarının genetik farklılıklarının ortaya çıktığı ve böylece oluşan virus varyantlarının konakçı spesifitesi göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca koyunların CAE virusu ile deneysel olarak enfekte edilebildiği ve virusun enfekte süt ve kolostrum ile kuzulara doğal yoldan bulaşabildiği de belirlenmiştir (Leroux ve ark., 1997). İsviçre’de Pisoni ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada MVV ile enfekte bir koyun-keçi sürüsüne CAE virusu deneysel olarak sokulduğunda MVV ve CAEV arasında rekombinasyon gerçekleştiği belirlenmiştir.

Koyun, keçi ve kedi lentivirusları, gag antijenleri arasında çapraz reaksiyon gösterebilirler. Bir CAE virus suşundan köken alan projeni virusların arasında çapraz reaksiyonun olduğu; buna karşın farklı saha suşları projenileri ile sözkonusu virusların çapraz reaksiyon oluşturmadığı bilinmektedir. CAEV antijen determinantları, tip spesifik ya da grup spesifik olabilir. Tip spesifik reaktiviteye

sahip olan antijen determinantları, zar yüzeyindeki glikoproteinler üzerinde bulunmaktadır (Rolland ve ark., 2002).

Çizelge 1.1. Retrovirusların Sınıflandırılması (ICTVdB)

RETROVİRİDAE AİLESİ		
<u>Orthoretrovirinae Alt Ailesi</u>		
Genus	Tür	
Alpharetrovirus	Avian leukosis virus (ALV)	
	Rous sarcoma virus (RSV)	
	Fujinami sarcoma virus (FuSV)	
Betaretrovirus	Mouse mammary tumor virus (MMTV)	
Deltaretrovirus	Bovine leukemia virus (BLV)	
	Human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1)	
	Human T-lymphotropic virus-2 (HT: LV-2)	
Epsilonretrovirus	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV)	
Gammaretrovirus	Xenotropic endogenous murine leukemia virus (XMRV)	
	Murine leukemia virus (MLV)	
	Feline leukemia virus (FeLV)	
	Guinea pig type C oncovirus (GPCOV)	
	Porcine typeC oncovirus (PCOV)	
Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	
	Feline immunodeficiency virus (FIV)	
	Ovine/caprine immunodeficiency virus	Caprine arthritis-encephalitis virus
		Visna/ Maedi virus
		Sınıflandırılmamış ovine/caprine lentivirüsleri
		Jaagsiekte koyun retrovirusu (JSRV)
	Simian immunodeficiency virus (SIV)	
	Equine immunodeficiency virus (EIV)	
Bovine immunodeficiency virus (BIV)		
<u>Spumaretrovirinae Alt Ailesi (Foamyviruslar)</u>		

Genus	Tür
Spumavirus	Foamyviruslar

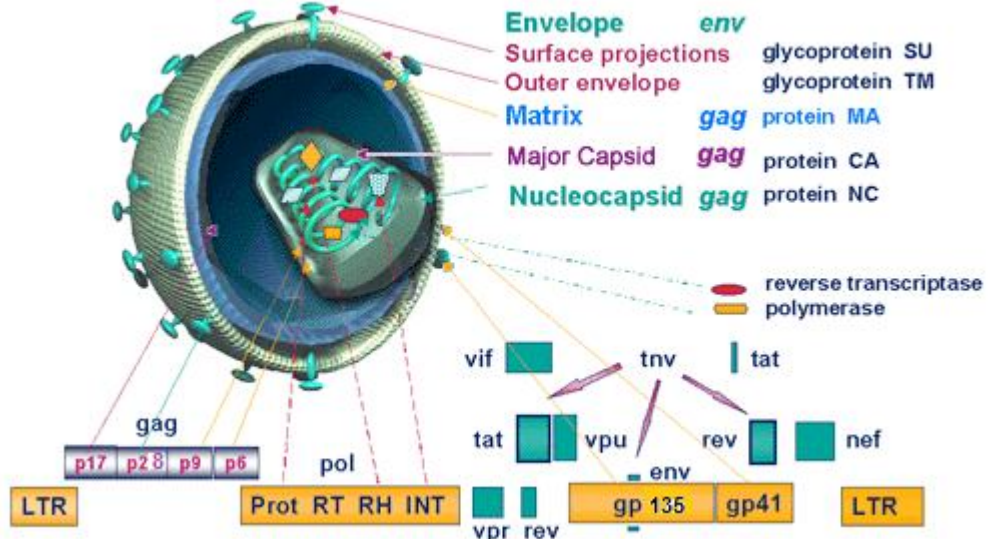
1.1.1. CAE Virusun Morfolojisi ve Genom Yapısı

CAE konak hücre membranına tomurcuklanma ile girişi sağlayan lipit yapıda zarı ile pileomorfik şekle sahiptir. Virusun çapı 80-120 nm kadardır. Büyüklüğü 8 nm olan ve zar yüzeyinde düzenli bir şekilde yayılım gösteren spike proteinleri, zar yüzeyinin pürüzlü görünmesine neden olmaktadır. Virus nükleokapsidi izometrik yapıdadır ve nükleik asit, çubuk ya da sivri ucu kesik bir koni görünümündedir (Granoff ve ark., 1999). Virion 7-10 kb büyüklüğünde pozitif polariteli ve tek iplikçikli 2 adet identik RNA molekülü içermektedir. RNA genomunun baz birleşimi; %38.2 A, %16 C, %25.1 G ve %20,8 U şeklinde olup, genom tekrarlanan bir dizilim (LTR-long terminal repeats) ile sonlanmaktadır (Coffin 1992).

Viral nükleik asitin 5' ucu R, U5, PB ve L olmak üzere 4 bölgeye ayrılmaktadır. R bölgesi kısa sekansa sahip, tekrarlanan bir bölgedir ve reverse transkripsiyon sırasında yeni nükleik asitin doğru bir şekilde oluşturulmasında rol oynar. U5 bölgesi PB ve R bölgeleri arasında bulunur ve kendine özgü kısa bir sekansa sahiptir. BP bölgesi taşıyıcı RNA'nın 3' ucuna komplementer olarak 18 baz içerir. L bölgesi okunmamıştır ve RNA'nın paketlenmesinde görev alır. 3' ucu ise PP (Polipürin), U3 ve R bölgelerini içerir. PP bölgesi reverse transkripsiyon boyunca pozitif ipliklikli DNA için primer görevindedir. U3, PP ve R bölgeleri arasında bulunur ve transkripsiyonda rol alırken, L bölgesi ise tekrarlanarak sonlanır (Coffin 1997).

Enfeksiyöz viruslar, virion proteinlerini kodlamakla görevli olan 3 ana gene sahiptir. Bu genler 5'-gag-pol-env-3' şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 1.1). Gag geni viral kapsid proteinlerinin oluşturulmasından, pol geni viral DNA'nın sentezlenmesinden ve virusun konak hücre genomu içine entegre olmasından, proteaz, virionun olgunlaşması sırasında gag ve pol genlerinin kodladığı olgun proteinler oluşana kadar proteolitik aktiviteden sorumludur. Env geninin kodladığı

proteinler ise virionun konak hücreye bağlanmasında ve girişinde görev almaktadırlar (Coffin 1992).



Şekil 1.1. CAE virusunun morfolojik ve genetik yapısı (www.unifr.ch/biochem)

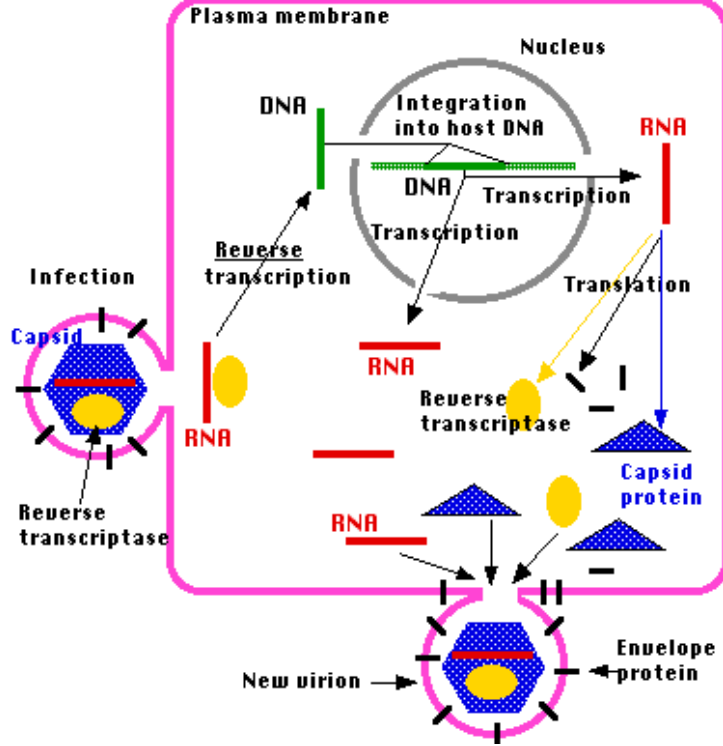
Virion bu 3 ana gen yanısıra farklı 4 gen daha içerir. Vif geni virusun replikasyonu için gereklidir. Tat geni; viral transkripsiyonu aktive eden küçük bir proteini kodlar. Rev geni; sitoplazmada bulunan ve viral RNA'lardaki değişiklikleri düzenleyen "Rev sorumlu element" (RRE)' i kodlamakla görevlidir. RRE, 200 nükleotid büyüklüğünde olan ve env gen bölgesinde bulunan sekonder bir RNA yapısıdır. RRE içeren mRNA' lar, gag, pol ve env genleri tarafından kodlanan yapısal proteinler, Rev geni varlığında sitoplazmada taşınabilir. dUTPase geni (Pseudoprotease) bölünemeyen primer keçi makrofajları içinde, replikatif siklusu hızlandırmaktadır (Granoff ve Webster, 1999; Harmache ve ark., 1995). Retrovirusların temel genlerine (gag, pol, env) ek olarak CAE virusunda bulunan ve transkripsiyon sonrası viral proteinlerin sentezlenmesini düzenleyen Rev geni üzerinde oluşan mutasyonların, nükleoler lokalizasyon kayıpları ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Saltarelli ve ark., 1994).

Virionun yapısal proteinleri, env viral geni tarafından kodlanan yüzey zar proteini (Gp 135) ve transmembran zar proteini (Gp 90) ile gag viral geni tarafından kodlanan ve çekirdek zarından köken alan kapsit proteini (P 28), transmembran (TM)

proteini ile etkileşim halinde olan matriks proteini (P 17), nükleik asiti bağlayan nükleokapsit proteinidir (Harmache ve ark.,1995). Virus dört adet yapısal olmayan protein içermektedir. Revers transkriptaz (RT) enzimi ve bu enzimin ilişkili olduğu büyüklüğü 51 kDa olan RNaseH enziminin oluşturduğu protein kompleksi virionun en büyük yapısal olmayan proteini oluşturmaktadır. Virionun diğer yapısal olmayan proteinleri; integraz, proteaz ve dUPTase enzimleridir (Granoff ve Webster, 1999).

1.1.2. CAE Virusun Replikasyonu

CAE virusun tropismus özelliğine sahip olduğu ve epitel hücreler içinde replike olduğu belirlenmiştir (Carpenter ve Chesebro, 1989). Virus replikasyonu, yüzey zar proteini SU' nun hedef hücreye tutunmasıyla başlar. Konak hücreye adsorbsiyonu tamamlandıktan sonra, virus ile hücre membranları arasında füzyon gerçekleşir. Konak hücre içine penetrasyonu takiben, zarlarından arınan viral RNA genomunun, proviral DNA'ya dönüşümü hücrenin sitoplazmasında başlar ve nükleusta tamamlanır. Viral nükleokapsit içinde, RNA genomuna bağlı ve eski iplikçiğe primer olan bir tRNA sentezlenir. Oluşan proviral DNA moleküllerinin bir kısmının, konak hücrenin DNA kromozomu içine entegre olması, hücre nükleusu içinde gerçekleşen ilk reaksiyonlardan biridir ve bu integrasyon işlemi mRNA' ların transkripsiyonu için gereklidir (Mselli-Lakhal ve ark., 2001; Zink ve ark., 1990). Birincisi ilk 24 saatte ikinci adımı ise enfeksiyondan 48 saat sonra olmak üzere iki basamaklı transkripsiyon aşaması sonrasında üretilen ürünler ve bu ürünlerin virionu oluşturmak üzere birleşmesi, hücre sitoplazması içinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (Granoff 1999).



Şekil 1.2. CAE virusunun replikasyonu (Krauthammer, 2005)

1.2. Epidemiyoloji

CAE virusu ile enfekte keçi sütü ve kolostrumunun yavrular tarafından oral yoldan alınması ve süt sağım ekipmanlarının viral kontaminasyonu enfeksiyonun en önemli bulaşma yolları olarak bilinmektedir (Adams ve ark.,1983; Rowe ve ark 1992b) . Transplental, perinatal nakil; salya, solunum yolu, gaita ve ürogenital sekresyonlar; enjektörler, küpeleme ve numaralama materyalleri gibi enfekte ekipmanların kullanımı ve kedi, köpek gibi hayvanların aracılığı ile virusun taşınması enfeksiyonun bulaşmasında etkili olan diğer faktörlerdir (Blacklaws ve ark., 2004; Lara ve ark., 2005; Matthews 1999; Peterhans ve ark., 2004; Sherman ve ark., 1992). Virus seminal plazmada belirlenmiş olup, doğal enfekte tekeler yolu ile bulaşma önemli bir orana sahiptir (Ali Al Ahmad ve ark., 2008a; Peterson ve ark., 2008).

Ömür boyu virus ile enfekte olan hayvanlarda viral yük miktarı değişebilmekte olup, klinik belirti gösteren ve göstermeyen hayvanların tümü

enfeksiyonu nakledebilmektedir. İnvitro fertilizasyon tekniklerinde kullanılması amacıyla, kontrol edilmemiş mezbaha hayvanlarından elde edilen keçi ovidukt epitel hücreleri, virusun epitel hücreler içinde çoğalma özelliği nedeniyle, CAEV enfeksiyonu için önemli bir risk kaynağı durumundadır. Araştırmalardan alınan sonuçlara göre, embriyo nakli ile enfeksiyonun bulaştığı bildirilmiştir (Lamara ve ark.,2002, Ali Al Ahmad ve ark., 2008b).

Enfeksiyonun zoonoz olmadığı belirlenmiştir. Isıya maruz tutulmamış keçi sütü içen insanlarda CAE virusu ile enfekte olma durumu bildirilmemiştir (Smith ve Sherman, 1994) .

1.3. Klinik Bulgular

CAEV ile enfekte olan keçilerde genellikle herhangi bir hastalık belirtisi görülmemektedir. Seropozitif keçilerde klinik arthritis görülme olasılığı %25'ten daha düşük orandadır. Fakat bu hayvanlar persiste olarak kalırlar ve yaşamları boyunca enfeksiyonu kolostrum, süt ve solunum sekresyonları ile saçarlar. Enfeksiyonun inkubasyon periyodu aylar hatta yıllar olabilmektedir (Smith ve Sherman, 1994; OIE, 2008) .

Başlıca klinik belirtiler arthritis, encephalitis, intersitisyel pneumoni ve mastitisdir (Matthews ve ark.,1999). Endemik durumlarda bu dört semptom tek tek olabildiği gibi kombine olarak da şekillenebilir, ancak bu durumda bir semptom baskın özellik göstermektedir. Aşırı kilo kaybı da genellikle bu semptomlara eşlik etmektedir (Smith ve Sherman, 1994).

CAE viral enfeksiyonunun arthritis formu hastalığın en belirgin semptomudur ve genellikle keçilerin seksüel olgunluğa geçtiği 6 aylık ya da daha ileri (genellikle 1-2 yaşında) yaşlardaki dönemlerinde görülmektedir (Knight ve Jokinen,1982; Leroux ve ark.,1997). Enfeksiyonun, kronik olarak gelişim gösteren ağrılı poliartthritis formu yaygındır ve aniden ortaya çıkan bir topallığa neden olmaktadır.

Etkilenen eklemler karpal, tarsal, kübiti, genu, atlantookspital ve coxofemoral eklemlerdir (K Pugh, 2002).

Enfeksiyonun encephalitis formu ise 2-6 aylık oğlaklarda görülmektedir. Enfekte yavrularda encephalitis, doğumdan 1 ay sonra gelişmeye başlar. Oğlaklarda topallık, koordinasyon bozukluğu, sallantılı yürüyüşü takiben, paraliz ve parezis gelişir (Knight ve Jokinen.,1982; Sherman ve ark., 1992).

CAEV enfeksiyonu, ender olarak kronik intersitisyel pneumoniye de sebep olmaktadır. Öksürük ile başlayan solunum sistemi semptomları, dispne, taşipne ve anormal akciğer sesleri ile daha da belirginleşir (K Pugh, 2002).

Enfeksiyonun mastitis formunda, klinik olarak katı, büyümüş ve süt alınamayan bir meme yapısı dikkati çeker. Mastitis genellikle doğum dönemlerinde ortaya çıkmaktadır ve “Hard Udder Sendromu” adı verilen sert ve büyük meme bezi ile karakterizedir (Knight ve Jokinen, 1982; Leitner ve ark., 2004). Klinik olarak belirlenebilen mastitis bulgularının daha ileri yaşlardaki keçilerde görüldüğü, süt üretiminde azalma, infertilite ve ölüm ile sonuçlanabildiği bildirilmiştir (Malher ve ark., 2001; Bergonier ve ark., 2003). Bazı olgularda zamanla meme bezinin yumuşayabilmesine karşın süt üretiminin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Linklater ve Smith 1993) .

1.4. Patogenez

CAEV enfeksiyonu slow virus enfeksiyonu olması nedeniyle, çok yavaş gelişim göstermekte, bununla birlikte multiple organ dejenerasyonu, kaşeksi ve ölüm ile sonuçlanmaktadır (Smith ve Sherman,1994). Enfeksiyöz ajan, süt ve kolostrum ile alındıktan sonra ince barsak kanalından emilerek dolaşım sistemine girer. Virus, konak hücre olarak makrofajlar gibi farklılaşma gösteren mononükleer hücreleri

enfekte eder ve monositler, makrofajlara olgunlaşana kadar monositler içinde kalır (Zanoni, 1998).

Enfeksiyon, virusun replikasyonu ve makrofajların olgunlaşması ile yayılır ve hedef dokularda lenfoproliferatif lezyonlar meydana getirir. Virus, akciğer intersitisyumu, meme bezi, synovia, choroid plexus ve lenf nodülleri gibi yumuşak dokulara yerleşir (Knight ve Jokinen, 1982). Memede mastitisin şekillenmesi ve normal meme dokusunun bozulması ile meme bezinde sertleşme meydana gelir (Linklater ve Smith, 1993) .

CAEV enfeksiyonunun arthritis formunda, arthrosentez ile alınan synovianın seröz kıvamda ve koyu sarıdan kahverengine kadar değişen renkte olduğu dikkati çeker. Bu sıvı ağırlıklı olarak lenfosit ve makrofajlar olmak üzere, mononükleer hücreleri içermektedir ve hücre sayısı 1000 hücre/mlt. den daha fazla olabilmektedir (Knight ve Jokinen., 1982; Linklater ve Smith 1993). Enfekte keçilerden alınan synovial membranlar üzerinde yapılan in-situ hibridizasyon çalışmalarında, aktive olan lenfositlerden salınan gama interferonun makrofajlardaki viral replikasyonu indüklediği belirlenmiştir (Granoff ve Webster, 1999; Tong-Starksen ve ark., 1996) .

Eklemlerdeki lezyonların mikroskopik görüntüsünde; synovial hücre hiperplazisi, subsynovial mononükleer hücre infiltrasyonu, lenfoid folliküller, synovial villus hipertrofisi, synovial ödem dikkati çekmektedir (Zink ve ark., 1987). Ayrıca synovial membranda ve eklem çevresindeki yumuşak dokularda gelişen nekrozlu bölgeler belirgin olarak görülebilmektedir (McGuire ve ark., 1986).

Enfeksiyonun viral lökoensephalitis formunda ise beyin omurilik sıvısında mononükleer pleositozis ile protein konsantrasyonunda artış, beyinin beyaz dokusunda nekroz ve değişik derecelerde demiyelinizasyonlar ile karakterize nörolojik lezyonlar dikkati çekmektedir (K Pugh, 2002; Linklater ve Smith, 1993).

Akciğer lezyonları ise; akciğerlerin katı bir kıvamda olup, gri pembe renk alması ve üzerinde multiple küçük beyaz odakların bulunması ile karakterizedir.

Kronik intersitisyel pnemoni gelişir. Akciğerler kollabe olmaz ve bronşial lenf yumruları genişlemiştir. Kranioventral ve kaudal akciğer loplari, mediastinal lenf yumrularının genişlemesine bağlı olarak büyümekte ve normal ağırlığının 2-3 katına çıkabilmektedir (OIE, 2008) .

1.5. Teşhis

CAEV enfeksiyonunun belirlenmesi serolojik ve virolojik olarak olmaktadır. “Altın standart” test olarak Western Blotting kabul edilmektedir (OIE, 2008).

Serumda CAE virusuna karşı oluşan antikor varlığının tespit edilmesi için AGID, ELISA ve İmmunperoksidaz testleri kullanılmaktadır (De Andres ve ark., 2005). Anti-CAE antikorlarının belirlenebilmesi amacıyla en çok kullanılan serolojik test AGID testidir (Carpenter ve Chesebro, 1989; Yavru ve ark., 2001). CAEV enfeksiyonu tespiti için kullanılan C-ELISA serum antikorlarının teşhisi için geliştirilmiştir. Bu metot ile CAEV yönünden pozitif hayvanların tespiti, indirek ELISA yöntemine oranla daha erken yapılabilmektedir (Herrmann ve ark., 2003; Rowe ve East, 1997) .

Virolojik olarak enfeksiyonun belirlenmesi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Southern Blotting, İn Situ Hibridizasyon teknikleri kullanılır (Rowe ve East, 1992a; Zink ve ark., 1987).

CAEV enfeksiyonunun belirlenmesi için kullanılan diğer bir metot ise, virus izolasyonudur. Virusun izolasyonu için EDTA’lı tüpte kan ve diğer sekresyon örnekleri ya da akciğer, synovial membran ve meme gibi nekropsi dokuları kullanılabilir (Heckert ve ark., 1992). Virus izolasyonunun duyarlılığı düşüktür. Virusun çok uzun inkubasyon periyoduna sahip olması nedeniyle üretilmesi güçtür ve genellikle 3-4 hafta sürebilmektedir. Buna ek olarak, Kuzey Amerika’da bulunan laboratuvarlarda üretilen CAE virusu stoklarının incelenmesi sonucunda

pestiviruslarla kontamine olabildiği de kesinlik kazanmıştır (Knowles, 1997; Oliver ve ark., 1984; Sherman ve ark., 1992).

1.6. Mücadele ve Korunma

CAEV enfeksiyonunun encephalitis formu için prognoz kötüdür. Klinik belirtilerin hiçbiri için spesifik bir tedavi yöntemi ve aşı uygulaması bulunmamaktadır. Enfekte hayvanlara destekleyici tedavi uygulanması yararlı olabilmektedir. CAEV ile enfekte olan ve arthritis formu görülen keçilere düzenli ayak tedavisi uygulaması ve eklemlere eklem yastığı yerleştirilmesi semptomların hafiflemesini sağlayabilmektedir. Bu amaçla fenilbütazon ve aspirin gibi NSAI (non steroid antiinflamatuvar) ilaçlar da kullanılabilir. Enfekte hayvanların yüksek kaliteli ve kolay sindirilebilen gıdalarla beslenmesi, aşırı kilo kaybını geciktirebilmektedir (Matthews; 1999; Oliver ve ark., 1984). Diyetteki mineral eksikliği hayvanları enfeksiyona predispoze hale getirmektedir. Rasyona bakır ilavesinin hastalığa karşı koruyucu etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (Matthews, 1999).

Tedavi amaçlı nitrogen bazlı pek çok proteaz ve reverse transcriptaz inhibitörü ilaçlar üretilmiştir. Ancak fiziksel ve kimyasal nedenlerle viral gen sekansında meydana gelen mutasyonlar bu ilaçların etkinliğini azaltmaktadır (Wainberg ve Friedland, 1998). Antibiyotik tedavisi; induratif mastitis ve intersitisyel pneumoni ile komplike olabilecek sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı endikedir (Matthews, 1999).

CAEV enfeksiyonunun kontrolü amacıyla, sürü içindeki tüm hayvanlar 6 aylık yaştan başlamak üzere, her 6 ayda bir enfeksiyon yönünden test edilmelidir. Seropozitif hayvanlar sürüden çıkarılmalı ve hemen kesime sevk edilmelidir (Rowe ve East, 1997). Seropozitif hayvanların sürüden çıkarılması uygun bulunmuyorsa, oğlağın annesini emmesi engellenmelidir. Oğlakların CAEV enfeksiyonu yönünden durumları belirlenene kadar seropozitif annelerden doğan oğlaklar ile seronegatif annelerden doğan oğlaklar ayrı tutulmalıdır (Blacklaws ve ark., 2004).

Oğlaklar pastörize edilmiş süt ve kolostrum ile beslenmelidir. Kolostrum 56°C'de 1 saat, 72°C'de 15 dakika kadar ısıya tabi tutulmalıdır. Bu ısıda immunglobulinler zarar görmeden kalırken virus inaktive olur (Knight ve Jokinen, 1982; Leroux ve ark., 1997). Süt sağım salonlarında ilk olarak seronegatif hayvanlar sağılmalıdır. Her sağım işlemi sonunda sağım salonu ve sağım ekipmanları dezenfekte edilmelidir (Blacklaws ve ark., 2004; Rowe ve East, 1997).

Sürüye yeni katılan hayvanların, CAEV enfeksiyonu yönünden kontrolü yapılmalı ve bu hayvanlar en az 60 gün kadar karantinada tutulmalıdır. Bütün hayvanlar sürüye eklenmeden önce, CAE virus yönünden seronegatif olduğu kesin olarak belirlenmelidir (Adams ve ark., 1983; Knowles, 1997) .

1.7. Bağışıklık

Aktif viral enfeksiyon, güçlü ama koruyucu olmayan bir humoral ve hücreselel yanıtın ortaya çıkmasını sağlar (McGuire ve ark.,1986). Serokonversiyon enfeksiyondan sonra 2-8 hafta ile birkaç aylık süre içerisinde meydana gelmektedir (Smith ve Sherman, 1994). Serokonversiyon gerçekleşmesi ile düşük de olsa bir vireminin bulunması, immun sistemin harekete geçtiğini gösterir. Bununla birlikte nötralizan antikorların ve hücre aracılı immunitenin bulunmasına rağmen, virus enfekte hayvanların makrofaj hücre hatlarında provirus olarak kalır (Cheevers ve ark., 1991).

İmmun sistemi korumak amacı ile canlı attenuue virus ve ölü virusla keçilerin immunizasyonu çalışmalarında başarı sağlanamamıştır ve bu immunizasyon çalışmaları daha ciddi patolojik lezyonlar ile sonuçlanmıştır (Adams ve ark., 1983; Granoff ve Webster, 1999).

1.8. CAEV Enfeksiyonunun Dünya ve Türkiye’ deki Durumu

Dünyada enfeksiyonun yayılımının araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, dünyanın 112’den fazla farklı bölgesinden toplanan 3729 adet kan örneği test edilmiştir. AGID testi kullanılarak yapılan çalışma sonunda 1265 adet pozitif serum örneği saptanmış olup, bu sayının %90’ından daha fazlasını Kanada, Fransa, Norveç, İsviçre ve Amerika’dan alınan serum örneklerinin oluşturduğu görülmüştür. İngiltere, Meksika, Kenya, Yeni Zelanda ve Peru’da %10 oranında pozitif sonuç bulunmuş, Somali, Güney Afrika ve Sudan’da ise pozitif sonuç gözlenmemiştir (Adams ve ark., 1984). Surman ve ark. (1984) tarafından yapılan çalışmada enfeksiyonun Avustralya’da da yayıldığı bildirilmiştir.

1980 yılının başlarında İsviçre’de CAEV enfeksiyonunun eradikasyonu için gönüllü bir program başlatılmıştır ve bu program 1998 yılından itibaren zorunlu duruma getirilmiştir. Bu eradikasyon programı çerçevesinde ülkedeki bütün keçiler her yıl, CAEV enfeksiyonu yönünden serolojik testlere tabi tutulmuş olup, seropozitif olarak saptanan hayvanlar kesime sevk edilmiştir. Seropozitif olarak saptanan hayvanların bulunduğu çiftliklerdeki sürülerin her yıl kontrolleri yapılarak, birbirini takip eden üç kontrolde negatif sonuç alınana kadar bu çiftlikler karantina altında tutulmuştur. Uygulanan eradikasyon programı sonucunda, ülkedeki CAEV enfeksiyonunun oranı 1980 yılının başlarında %83 iken, 1984’ te %60’a, 1996’da %5’e ve 2002 yılında ise %1’e düştüğü belirlenmiştir (Shah ve ark., 2004; Zaroni, 1998) .

Enfeksiyon 2002 yılında Japonya’da görülmeye başlanmış, 2002-2004 yılları arasında test edilen 3102 keçi serumunun 605 (%19,5) adedinde anti-CAEV antikoru saptanmıştır. Japonya’da CAEV enfeksiyonu AGID, PCR, virus izolasyonu, indirek immunfloresan testi gibi teşhis metotları kullanılarak belirlenmiş ve bunu takiben OIE eradikasyon programı uygulanarak enfeksiyonun oranı önemli ölçüde azaltılmıştır (Konishi ve ark., 2004).

1998 yılında 16 Avrupa ülkesinin işbirliği içinde ve COST (Co Operation in the field of Scientific and Technical Research) çerçevesinde yürütülen ve küçükbaş gevişen lentiviruslarının araştırılmasına ilişkin bir kontrol programı oluşturulmuştur. Bu program dahilinde SRLV'nin yayılmasının nedeni, bilimsel çalışmaların yetersizliği, ülkelerarası canlı hayvan ticareti ve bölgesel farklılıklar olarak belirlenmiştir. Böylece enfeksiyonun bulaşma yollarının önüne geçilmesi ve ülkelerin politik kontrol programlarını uygulamaları ile hastalığın yayılmasının engellenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma çerçevesinde, yerel ve politik önlemler alınarak “CAEV-free” bölgeler tanımlanmıştır ve çoğu Avrupa ülkesinde (bunlardan bazıları Fransa, İtalya, İspanya, Almanya) enfeksiyon oranının %1'e düştüğü görülmüştür (Peterhans ve ark., 2004).

Türkiye'de ise CAEV enfeksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Burgu ve ark.(1994) tarafından yapılan çalışmada, İç Anadolu, Ege, Doğu Anadolu ve Batı Karadeniz Bölgelerinde yer alan farklı illerdeki (Ankara, Muğla, Eskişehir, Adana, Aydın, Gaziantep, Zonguldak, İzmir) yedi adet özel ve üç adet kamu işletmesinden sağlanan toplam 808 adet keçi serum örneğinde CAEV enfeksiyonuna karşı oluşan antikor dağılımı AGID testi kullanılarak incelenmiş ve serum örneklerinde %1,9 pozitiflik belirlenmiştir.

Yavru ve ark. (2001) tarafından yapılmış olan çalışmada, Türkiye'deki keçilerde görülen CAEV enfeksiyonunun serolojik teşhisinde kullanılan ELISA ve AGID testlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada Yozgat ve Konya illerindeki farklı çiftliklerden elde edilen toplam 190 adet serum örneği, her iki teşhis yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Araştırma sonucunda, AGID testi ile %1.57 oranında, ELISA ile %3.68 oranında pozitiflik saptanmıştır. Sonuç olarak bu illerde CAEV enfeksiyonunun varlığı kesinleştirilmiş ve hastalığın teşhisinde ELISA yönteminin AGID testine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çimtay ve ark. (2004) tarafından yapılmış olan çalışmada, Şanlıurfa yöresindeki keçilerde CAEV ve koyunlarda Visna-Maedi enfeksiyonlarının seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Serolojik muayeneler için ticari CI-

ELISA test kitleri kullanılmış ve 300 keçinin 18'inde (%6) CAEV enfeksiyonu belirlenmiştir. Klinik olarak arthritisi olduğu belirlenen 18 keçinin 4'ü (% 22,2) ve arthritisi semptomu göstermeyen 282 keçinin ise 14'ü (%4,9) CAEV enfeksiyonu yönünden seropozitif olarak saptanmış ve bu iki oran arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğu gözlenmiştir. Araştırmaya alınan 300 koyunun 30'u (%10) MVV enfeksiyonu yönünden seropozitif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar (Çimtay ve ark., 2004), Şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerin MVV ve CAEV enfeksiyonları yönünden göz ardı edilemeyecek oranlarda seropozitif olduklarını saptamışlardır.

Aslantaş ve ark.(2005) tarafından yapılmış olan çalışmada ise; Hatay ilinin 6 farklı yöresinde bulunan Damascus ve Kilis keçilerinden elde edilen 675 serum örneği AGID ve C-ELISA teknikleri ile incelenmiş olup, C-ELISA ile %1,03 oranında pozitiflik belirlenmiştir.

1.9. Tezin Amacı

Bu çalışmada, ülkemizde varlığı daha önce yapılan araştırmalarda tespit edilen CAEV enfeksiyonunun prevalansına ilişkin güncel verilerin elde edilmesi, CAEV enfeksiyonunun tanısında kan ve süt örneklerinin tanı materyali olarak kullanılabilirliği, enfeksiyonun teşhisinde ELISA ve PCR tekniklerinin tanısal değerlerinin araştırılması ile yerel suşlarının genetik karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Tamı Materyalleri

Bu araştırmada CAEV enfeksiyonunun serolojik ve virolojik teşhisi amacıyla 2007-2010 yılları arasında farklı coğrafik bölgelerde (İç Anadolu, Akdeniz, Ege, Marmara) yer alan 8 işletmeden toplam 435 keçi kanı antikoagulan içeren ve içermeyen 2 tüpe ve 285 adet keçi sütü rastgele örnekleme metodu ile toplandı (Çizelge 2.1).

2.1.1.1 Kan ve Süt Serumı Örnekleri

Serolojik çalışmada 6 farklı ilde yer alan kamu işletmesi, özel işletme ve halk elinde bulunan sürülerden 6 aylık yaştan üzerindeki keçilerden alınan 435 adet kan ve 285 adet süt serumu örneği kullanıldı.

Çizelge 2.1. Araştırmada kullanılan tanı materyallerine ait veriler

İşletme Kodu	Yer	İşletme Tipi	İrki	Kan Örneği Sayısı	Süt Örneği Sayısı	Örnekleme Zamanı
A	Ankara	Özel İşletme	Saanen	105	91	13.04.2009 12.02.2010
B	Ankara	Aile İşletmesi	Saanen	75	68	22.06.2009
C	Eskişehir	Kamu İşletmesi	Tiftik	152	52	20.11.2007 14.04.2008
D	Burdur	Aile İşletmesi	Tiftik	20	19	14.09.2008
E	Burdur	Aile İşletmesi	Tiftik	30*	29	15.03.2009
F	Antalya	Aile İşletmesi	Tiftik	23	4	8.04.2009
G	Kırklareli	Aile İşletmesi	Tiftik	22	22	1.04.2009
H	Kütahya	Aile İşletmesi	Tiftik	8	0	16.05.2009
TOPLAM				435	285	

*Yalnızca kan serumu örneği bulunmaktadır.

2.1.1.2. Virus Nükleik Asiti Tespiti Amacıyla Kullanılan Materyaller

Tanı materyali olarak toplanan kan ve süt örneklerinden ELISA ile sağlanan CAEV antikor sonuçları da değerlendirilerek, antikor saptanan ve saptanmayan hayvanları temsilen seçilen keçilerden alınan 70 adet kan örneği ve 16 adet süt örneği CAEV nükleik asiti yönünden araştırıldı.

2.1.2. ELISA Kiti

CAE virusuna spesifik olan antikorların tespiti amacıyla ticari olarak temin edilen ELISA (Institute Porquier, Kat. No: P00303, Fransa) kiti kullanıldı.

2.1.3. Nested PCR ve Klonlama Kitleri

Çalışmalarda kullanılan Taq polimeraz enzim, 100 bp DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya), primerler ve elde edilen pozitif PCR örneklerin dizin analizinin yapılabilmesi amacıyla klonlanması için kullanılan klonlama kiti (pGEMt Easy Vector System, Promega, USA) ticari olarak temin edildi.

Amplifikasyonlarda kullanılan gag bölgesine özgül primerler (Chebloune, 1996a) ve hücre DNA'sının internal kontrolü amacıyla β -actin geninin 40.Exon bölgesine spesifik primerler (Bouzar ve ark., 2007) Çizelge 2.2'de gösterildi. Nested PCR testlerinin optimizasyonu amacıyla kontrol olarak Fransa Joseph Fourier Üniversitesi-Jean Roget Enstitüsünde GSM hücresinde izole edilen bir saha izolatu kullanıldı.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizinleri ve genom lokalizasyonları

Primer Kodu	Primer dizini (5'→ 3')	Lokalizasyon (nt)	Ürün büyüklüğü (bp)	Referans
GACA ex5	GAAGTGTTGCTGCGAGAGGTCTTG	393-1291	898	Chebloune, (1996a)
GACA ex3	TGCCTGATCCATGTTAGCTTGTGC			
GACA in5	GATAGAGACATGGCGAGGCAAGT	524-1036	512	
GACA in3	GAGGCCATGCTGCATTGCTACTGT			
ES ex 30	TCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAG	393		Bouzar ve ark., (2007)
ES ex 32	CCAGGGGAAGGCTGGAAGAGTGCC			
ES in 31	CCCCAGCCATGTACGTTGCTATCC			
ES in 33	GCCTCAGGGCAGCGGAACCGCTCA			

2.2.Yöntem

2.2.1.Serolojik Çalışma

2.2.1.1. Kan Serumı Örneklerinin Hazırlanması

Silikonlu vakumlu tüplere (Vacuette, Kat No: 455071/A100480, Greiner, Almanya) alınan keçi kan örnekleri pıhtılaştıktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifuj (Eppendorf, 5810 R, Almanya) edilerek serumları ayırt edildi. Stok tüplere aktarılan serumlar test edilinceye kadar – 20°C’ de saklandı.

2.2.1.2. Süt Serumı Örneklerinin Hazırlanması

Cam tüplere alınan süt örnekleri 10 dakika süre ile 2000 rpm’de santrifuj edildi ve tüp üzerinde biriken yağ tabakası bir spatula yardımıyla alındıktan sonra elde edilen süt serumu serolojik test için kullanıldı. Serolojik teşhis amacıyla alınan kan ve süt serumu örnekleri ticari ELISA kiti kullanılarak virus zar proteinine karşı oluşan antikorların varlığı yönünden kontrol edildi.

2.2.1.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Örneklenen 435 adet kan ve 285 adet süt serumu örneği ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın bildirmiş olduğu prosedüre göre test edildi.

Bu amaçla her bir kan ve süt serumu örneği ELISA tabletinin gözlerinde sulandırıcı ile 1:20 oranında sulandırıldı ve 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında 1:20 oranında hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile tabletler 3 kere yıkandıktan sonra 1:100 oranında hazırlanmış olan konjugattan tüm gözlere 100 µl

ilave edildi ve tabletler tekrar 37°C’de 1 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon süresi sonunda yıkama işlemi tekrarlandı ve her göze 100 µl substrat konuldu. Tabletler karanlık bir ortamda, oda ısısında 10 dakika kadar bekletildikten sonra tabletin tüm gözlerine durdurma solüsyonu konularak reaksiyon sonlandırıldı. Tabletler 450 nm dalga boyuna sahip filtrenin kullanıldığı ELISA okuyucusunda (Titertek, Finlandiya) okutuldu. Elde edilen absorbans değerleri sözkonusu kitin protokolünde belirtildiği şekilde değerlendirildi.

2.2.2. Virolojik Çalışma

2.2.2.1. Virus Nükleik Asit Tespiti için Kullanılan Materyallerin Hazırlanması

2.2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Virolojik teşhis amacıyla EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic asit) içeren vakumlu tüplere (Vacuette, Kat no: 455036/ A040409, Greiner, Almanya) alınan kan örnekleri 2000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma atılarak lökosit tabakası alındı ve 3 defa antibiyotikli PBS ile yıkandı. PCR testi yapılncaya kadar – 80 °C’ de muhafaza edildi.

2.2.2.1.2. Süt Örneklerinin Hazırlanması

Serolojik test amacıyla süt örneklerinin santrifüj ve yağ tabakasından arındırılması sonrasında dibe çökmüş olan epitel hücreleri 2 ml W-PBS ile sulandırılarak 1500 devirde tekrar santrifüjü yapıldı. Bu yıkama aşamasından sonra tüpün dibinde kalan hücreler % 10 FDS ve %10 DMSO (Dimethyl sulphoxide) ilave edilerek PCR testi yapılncaya kadar – 80°C’ de muhafaza edildi.

2.2.2.1.3. DNA Ekstraksiyonu

Proviral DNA'nın elde edilebilmesi amacıyla Chomczynski ve Sacchi, (1987) tarafından bildirilen Guanidin tiyosiyonat- Fenol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 300 µl test örneği 300 µl solüsyon D (4,2 M Guanidin tiyosiyonat, 0,75 M Sodyum sitrat dihidrat, 0,33 M N-Lauril sarcosin ve 360 µl 2- merkaptotanol) karışımı buz içinde bulunan 1,5 ml hacimli kapaklı mikrosantrifüj tüpü (Greiner Bio-one Kat No: 616201) içerisinde bir araya getirildi ve 10-15 saniye vorteks (Heidolph, Almanya) ile karıştırıldı. Karışım üzerine sırasıyla 325 µl alkali fenol (Fenol, 0,5 M Tris, 8-Hidroksiquiniline), 325 µl Kloroform- İzamilalkol [Ch/IsoA (24:1)] eklendi ve homojen bir karışım elde edilene kadar 15 saniye vortex ile karıştırıldı. Emülsüfiye olan karışım oda ısısında 13000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki fazdan 700 µl alınarak, buz içindeki yeni santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine eşit hacimde -20° C'ye soğutulmuş 2-İzopropanol ve 100 µl 3 M Sodyum asetat (pH 5,2) ilave edildikten sonra vortex ile karıştırıldı. Nükleik asit presipitasyonu için karışım en az 1 saat süre ile -80° C'de bekletildi. Süre sonunda donmuş olan karışımlar oda ısısında eritildikten sonra, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpünün üst kısmındaki sıvı atıldıktan sonra çökmüş olan DNA peleti, % 70' lik etanol (-20° C'de soğutulmuş) ile yıkandı ve etüvde (37°C) kurutuldu. Kurutulan peletler 50 µl steril deiyonize su (18 Mohm/cm, Applichem, Almanya) ile sulandırıldıktan sonra kullanılabileceği kadar -20° C'de saklandı.

2.2.2.1.4. Nested PCR Ürün Eldesi

CAEV nükleik asiti tespiti amacıyla keçilerden sağlanan kan ve süt örnekleri CAE virusunun gag gen bölgesine spesifik primerler (Chebloune ve ark., 1996a) (Çizelge 2.2) kullanılarak ve Ali Al Ahmad ve arkadaşları (2008a) tarafından bildirilen metot modifiye edilerek nested PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan PCR karışım bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (μl)
Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄ içeren 10 X Taq buffer	5
25 Mm MgCl ₂	5
10 Mm dNTP mix	2
Primer CAEV GACA ex 5/ in 5 (20 pmol/ μ l) β - actin ES 30/ ES 31(20 pmol/ μ l)	2
Primer CAEV GACA ex 3/in 3 (20 pmol/ μ l) β - actin ES 32/ ES 33 (20 pmol/ μ l)	2
Distile su	28,5
DNA	5
TOPLAM	50

DNA amplifikasyonu için tanımlanan 50 μ l lik PCR karışımının bileşimi Çizelge 2.3’de sunulmuştur. CAEV GACA ex-5 ve ex-3 ile birinci tur PCR reaksiyonunu takiben daha spesifik ürün elde edebilmek için, GACA in-5 ve in-3 primerleri ile ikinci tur PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. DNA izolasyonunun doğruluğunun tespiti amacıyla internal kontrol olarak β -actin geninin 40.Exon bölgesine spesifik primerler kullanılarak, aynı şartlarda nested PCR yapıldı. Termal çevirici cihazında bulunan reaksiyon tüplerine 94°C 5 dakikalık ilk denatürasyon basamağını takiben 46°C’de 90 saniye, 60°C’de 2,5 dakikalık 35 döngüden oluşan çoğaltma basamakları uygulandı. Çoğaltma işlemi 46°C’de 90 saniye ve 60°C’de 15 dakikalık son uzama basamağından oluşan ısı döngüleri ile tamamlandı.

2.2.2.1.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntülenmesi

PCR ürünlerini jelde görüntülemek amacıyla, %1' lik yoğunlukta olacak şekilde agaroz (Prona, EU) 0,5 X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) elektroforez tampon solüsyonu ile erlenmayer içerisinde sulandırıldı ve mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi. Agaroz 50-60 °C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 0,5 µg/ml ethidium bromide (Sigma, ABD) eklendi ve tarakları takılı olan jel taşıyıcısına döküldü. Agarozun donmasını takiben taraklar uzaklaştırıldı ve jel taşıyıcısı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına, jelin üzerinde 2-3 mm yüksekliğe ulaşana kadar 0,5 TAE buffer ilave edildi. Jeldeki ilk göze PCR ürünlerinin belirlenebilmesi için 1 µl DNA merdiveni (100 bp, Fermentas, Litvanya) konuldu. PCR ürünleri 5 kısım PCR ürünü 1 kısım 6xyükleme boyası (10 mM Tris-HCl, % 0.03 bromophenol blue, % 60 gliserol, 60 mM EDTA) olacak şekilde karıştırıldıktan sonra diğer gözlerle taşındı. 8 volt/ cm elektrik akımı uygulanarak 30 dakika süreyle DNA ürünlerinin göçü sağlandı. Jel, süre sonunda CCD kamera bağlantılı UV transimilatöre (Vilber Lourmat, Fransa) nakledildi ve jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) yardımı ile DNA merdiven paralelinde 512 bp büyüklükte ürünler yönünden incelendi.

2.2.2.1.6. CAEV PCR Ürünlerinin Klonlanması

Nested PCR ile CAE virusu nükleik asiti yönünden pozitif olarak belirlenen ürünlerin saflaştırılması işlemi ticari pürifikasyon kiti (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Kat. No: 04983912001, Roche, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen prosedüre göre gerçekleştirildikten sonra saflaştırılan ürünler dizin analizi öncesinde uygun vektör kullanılarak klonlandı (pGEMt Easy Vector System, Promega, USA). Bu amaçla 5 µl DNA örneği, 10 µl ligasyon sulandırma solüsyonu, 1 µl ligaz enzimi, 1 µl pGEM-t vektör ve 3 µl deiyonize su olacak şekilde ligasyon karışımı hazırlandı ve bir gece boyunca 16°C'de inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonu takiben transfeksiyonun gerçekleştirilmesi amacıyla elde edilen ligasyon ürününden

5 µl alınarak 60 µl kompetan hücre (JM 109 Competant Cells, $> 10^8$ cfu/ µg, Promega, Kat. No. L2001) içine aktarıldı ve buz üzerinde 40 dakika inkubasyona bırakıldı. Transfeksiyon sonrasında hücreler ısısı 42°C olan su banyosunda 3 dakika süreyle tutuldu. Isı uygulaması sonrasında tüplere daha önce hazırlanmış olan LB mediumdan (LB Broth, Luria Bertani, LABM, Kat No:079173/293, UK) 1 ml eklenerek, 37 °C'lık karıştırıcıda 2 saat süre karıştırıldı. Karıştırıcıdan alınan tüpler 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 800 µl süpernatant atıldıktan sonra kalan 200 µl bakteri resuspanse edildi ve antibiyotik eklenerek hazırlanmış olan LB agarlara (LB Agar, Luria Bertani, LABM, Kat No:079948/323, UK) yayıldıktan sonra petriler 37 °C'de bir gece inkubasyona bırakıldı. LB agar içeren petrilerde üretilmiş olan bakteri kolonileri içinde 4 ml LB medium (antibiyotik eklenerek hazırlanmış) bulunan tüplere aktarıldı ve 37 °C'ye ayarlanmış karıştırıcıda 1 gece inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrasında plazmid vektörlerin bakteriden izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaç için plazmid izolasyon kiti (QIAprep Miniprep Kit, Kat No: 27104, QIAGEN, Almanya) kullanılarak firma tarafından önerilen prosedüre göre plazmid ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler %1 oranında hazırlanmış agaroz jel elektroforezinde görüntülenip kontrol edildikten sonra dizin analizi öncesinde saflaştırılması işlemi ticari pürifikasyon kiti (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, Kat No: 04983912001, Roche, Almanya) kullanılarak firmanın önermiş olduğu prosedüre göre yapıldı.

2.2.2.1.7. Dizin Analizi

Temizlenmiş olan PCR ürünleri dizin analizi öncesinde Dye Terminatör Cycle Sequencing (GenomeLab DTCS-Quick Start Kit, Kat No: 08120, Beckman Coulter, USA) kiti ile işaretlenme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için kullanılan karışım bileşenleri ve takip edilen ısı döngüleri Çizelge 2.4' de sunuldu. Reaksiyon bitiminde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan etanol ile yapılan yıkama işlemlerinden sonra, oda ısısında bir gece boyunca kurumaya bırakıldı. İşaretlenmiş olan ürünler kapillar elektroforetik seperasyon için dizin analizi cihazına (Beckman Coulter CEQ 8000,

USA) yerleştirildi. Elde edilen ham veriler Beckman Coulter tarafından sağlanan özel bir yazılım yardımıyla analiz edildi.

Çizelge 2.4. Dizin analizi çalışmalarında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Dizin Analizi Reaksiyon Bileşenleri		Isı Döngüleri
Bileşen	Miktar (µl)	A. 96 °C’de 6 dakika B. 96 °C’de 20 saniye C. 50 °C’de 6 dakika B ve C basamakları 30 döngü tekrarlandıktan sonra; D. 60 °C’de 4 dakika E. 4 °C’de 10 dakika
DNA	4	
Primer	1	
DTCS	4	
Sulandırıcı	1	
Toplam	10	

2.2.2.1.8. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Plazmid vektöre yerleştirilerek saflaştırılan yerel CAEV gag amplikonlarının elde edilen nükleotid dizinleri dünya Gen Bankasına gönderildi ve bu dizinlere ait kayıt numarası (Accession numarası) alındı. Daha sonra elde edilen dizinler CLC Bio DNA Workbench (Danimarka) analiz programı kullanılarak kendi aralarında ve Gen Bankasından elde edilen referans CAE virusunun farklı suşlarının gag gen bölgesi dizin analizleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler aynı program kullanılarak filogenetik harita üzerinde gösterildi.

3. BULGULAR

3.1. Serolojik Çalışma

3.1.1.ELISA Sonuçları

ELISA kiti ile yapılan çalışma sonunda 435 adet kan serumunun 37 (%8,5) adedinde, 285 adet süt serumunun 14 (%4,9) adedinde CAE virusuna spesifik antikor varlığı saptandı (Çizelge 3.1). Örneklenen 8 sürüden 7 adedinde antikor tespit edildi. Süt örnekleri alınabilen 7 sürüden ise 3 adedinde süt serumunda antikor varlığı tespit edildi.

Çizelge 3.1. Kan ve süt örneklerinin ELISA sonuçları

İşletme Kodu	Test edilen Kan Örneği Sayısı	Kan Örneklerinde ELISA Pozitifliği (%)	Test Edilen Süt Örneği Sayısı	Süt Örneklerinde ELISA Pozitifliği (%)
A	105	22 (20,9)	91	9 (9,8)
B	75	5 (6,6)	68	1 (1,4)
C	152	6 (3,9)	52	4 (7,6)
D	20	1 (5)	19	-
E	30	1 (3)	29	-
F	23	-	4	-
G	22	1(4,5)	22	-
H	8	1 (12)	-	-
TOPLAM	435	37 (8,5)	285	14 (4,9)

Çalışmada 285 adet keçiden sağlanan kan ve süt örnekleri karşılaştırıldığında, 4 (%1,4) adedinin sütünde, 20 (%7,0) adedinin kanında seropozitiflik saptanırken, örneklenen hayvanlardan 10 adedinde ise (%3,5) örneklerin her ikisinde de spesifik CAEV antikorlarının varlığı belirlendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kan ve süt örneklerinin ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

İşletme Kodu	Test edilen kan ve süt örneği sayısı	Kan (+) Süt (+)	Kan (-) Süt (+)	Kan (+) Süt (-)	Kan (-) Süt (-)
A	91	7	2	14	68
B	68	1	-	2	65
C	52	2	2	1	47
D	19	-	-	1	18
E	29	-	-	1	28
F	4	-	-	-	4
G	22	-	-	1	21
TOPLAM	285	10 (%3,5)	4 (%1,4)	20 (%7,0)	251 (%88,0)

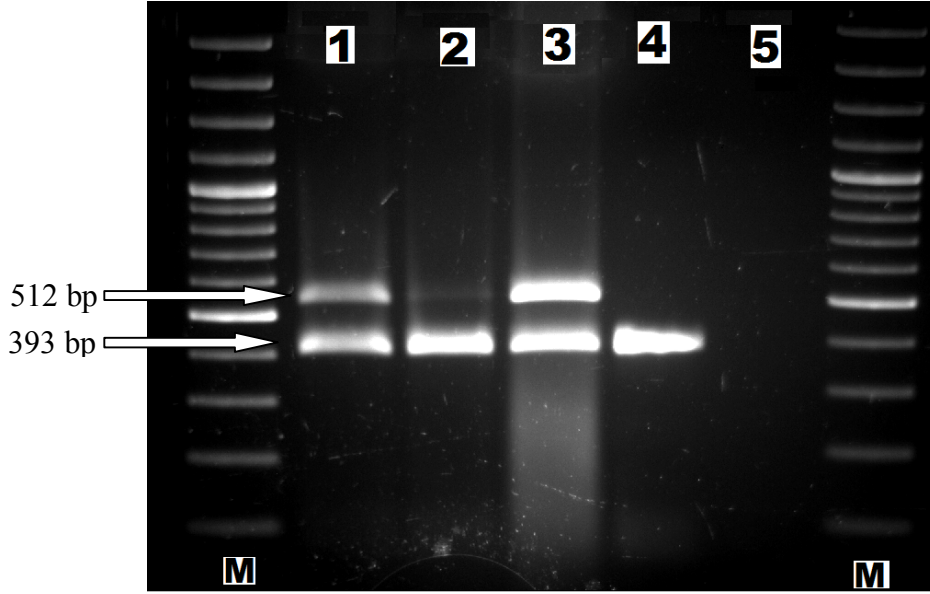
Çalışmada örneklenmiş olan 435 adet keçiden 180 adedi sütçü Saanen ırkı 255 adedi Tiftik keçisidir. Saanen ırkı keçilerde %15,0 (27/180) oranında seropozitiflik belirlenirken, tiftik keçilerinde %3,9 (10/255) oranında seropozitiflik belirlendi. İki ırk için saptanan seropozitiflik oranları ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde, oranlar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,001$).

3.2. Virolojik Çalışma

3.2.1. Nested PCR Testi Sonuçları

CAEV enfeksiyonunun varlığı ELISA testleri ile kesinleştirilmiş olan sürülerden seçilen lökosit ve süt örneklerine virus nükleik asitinin tespiti amacıyla gag genine spesifik primerler kullanılarak nested PCR testleri uygulandı. Bütün nested PCR denemelerinde DNA izolasyonunun doğru yapıldığının göstergesi olan β -actin geninin 393 bp uzunluğundaki bölgesi kullanılırken, kontrol virus olarak Fransa

Josep Fourier Üniversitesi-Jean Roget Enstitüsünde izole edilen virusun gag geninin 512 bp uzunluğundaki parçasının proviral DNA amplifikasyonu kullanıldı (Şekil3.1).



Şekil 3.1. Nested PCR testi sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel görüntüsü

[M: DNA merdiveni, 1,2: pozitif saha örneği, 3: pozitif kontrol, 4: negatif saha örneği, 5: negatif kontrol (Distile su)].

Çalışmada sağlanan 435 adet kan örneği ve 285 adet süt örneği içinden seropozitif olarak belirlenen 23 adet keçi kan örneği ve 5 adet keçi süt örneği, seronegatif olarak belirlenmiş olan 47 adet keçi kan örneği ve 11 adet süt örneği seçilerek CAEV genomu gag geni spesifik primerler kullanılarak nested PCR testlerine tabi tutuldu. Nested PCR yapılan kan ve süt örneklerinin sonuçları Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Kan ve süt örneklerinin nested PCR sonuçları

İşletme Kodu	Test edilen kan örneği sayısı	Kan Örneklerinde PCR Pozitifliği	Test edilen süt örneği sayısı	Süt Örneklerinde PCR Pozitifliği
A	19	8	7	7
B	12	-	2	-
C	21	4	2	-
D	5	1	-	-
E	2	-	2	1
F	3	-	1	-
G	5	-	2	-
H	3	1	-	-
TOPLAM	70	14 (%20,0)	16	8 (%50,0)

Nested PCR ile CAEV nükleik asidi yönünden araştırılan 70 adet lökosit örneğinin 14 (% 20,0) adedi, 16 adet süt örneğinin 8 (% 50,0) adedi CAE virusu nükleik asiti yönünden pozitif olarak belirlendi. Seropozitif olarak belirlenmiş olan 23 adet lökosit örneğinin 3 (%4,2) adedi ile seronegatif olarak belirlenmiş olan 47 adet kan örneklerinin 11 (%15,7) adedi nested PCR testi ile pozitif olarak belirlenirken, ELISA sonuçlarına paralel olarak 36 (%51,4) adedi nested PCR ile de negatif olarak belirlendi. Seropozitif olarak belirlenmiş olan 5 adet süt örneğinin 1 (%6,2) adedi, seronegatif olarak belirlenen 11 adet süt örneğinin 7 (% 43,7) adedi nested PCR testleri ile pozitif olarak belirlenirken, 4 (%25,0) adedi nested PCR testi ile negatif sonuç verdi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. ELISA ve nested PCR sonuçlarının karşılaştırılması

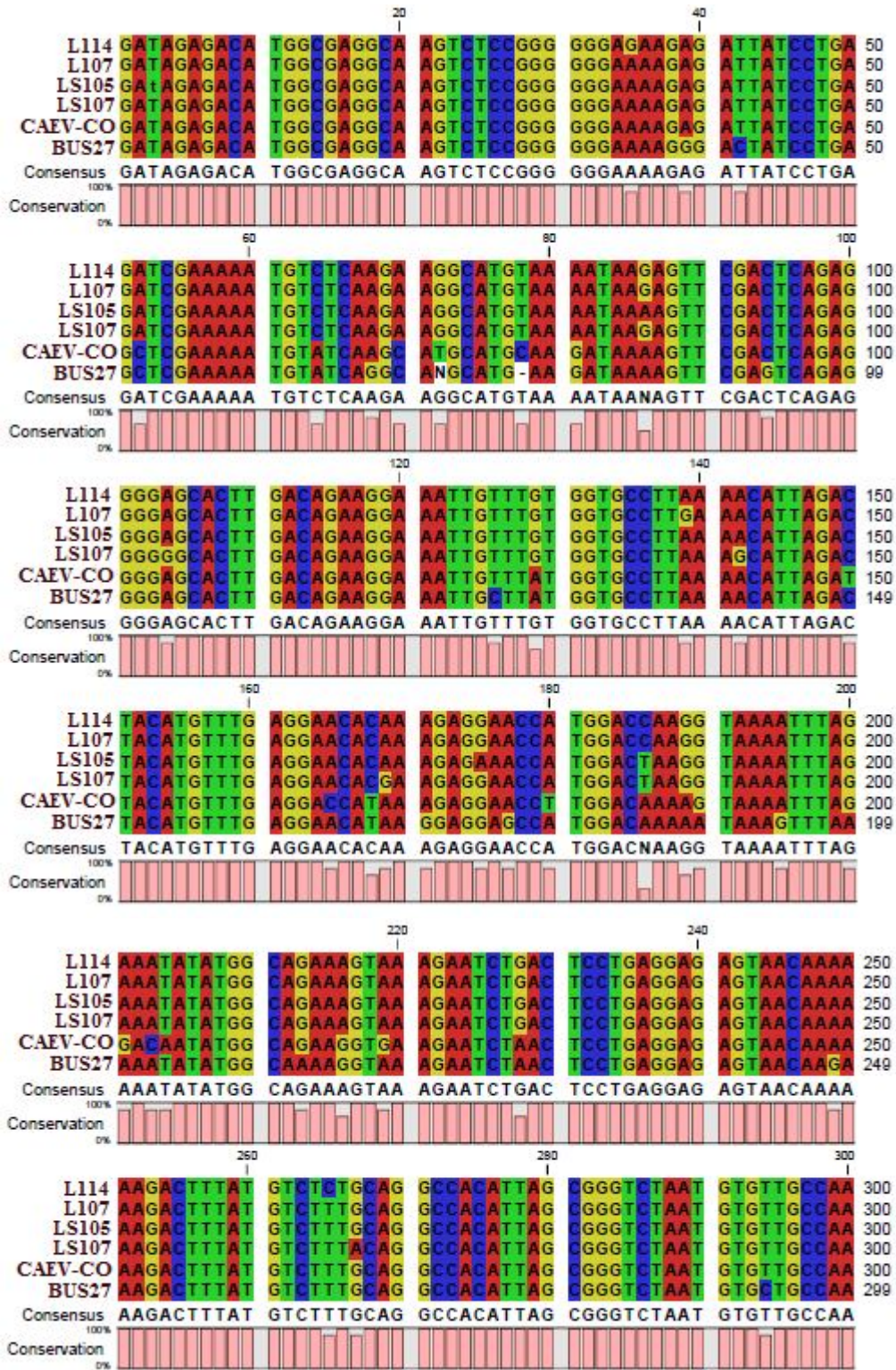
Test Edilen Örnek	Test Edilen Örnek Sayısı	ELISA(+) PCR (+)	ELISA (-) PCR(+)	ELISA(+) PCR(-)	ELISA(-) PCR (-)
LÖKOSİT	70	3 (% 4,2)	11 (% 15,7)	20 (%28,5)	36 (%51,4)
SÜT	16	1 (% 6,2)	7 (% 43,7)	4 (% 25,0)	4 (% 25,0)

3.2.2. Dizin Analizi Sonuçları

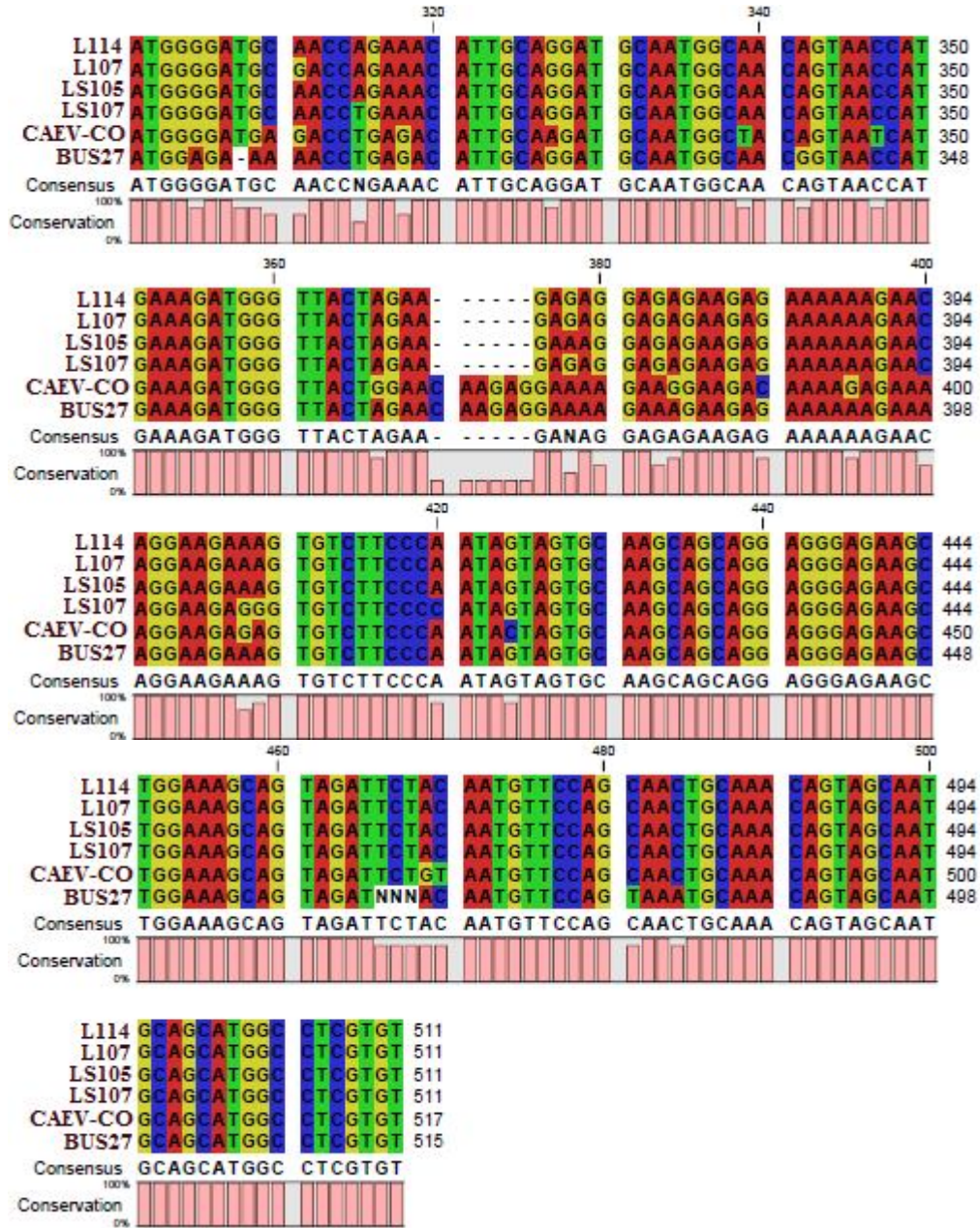
PCR testleri sonucunda pozitif olarak belirlenen 2 farklı ilden sağlanmış olan örneklerden dizin analizine uygun olabilecek kadar güçlü olduğu tespit edilen ürünlerin plazmid içine klonlama işlemi gerçekleştirildi. Çalışmada 2 farklı sürüden 3 adet süt örneği ve 2 adet kan örneği olmak üzere toplam 5 adet klon elde edildi (Çizelge 3.5). Plazmid içerisine klonlanmış olan PCR ürünlerinin dizin analizi gerçekleştirildi. Elde edilen ham veriler hem CLC dizin analizi programında hem de manuel olarak kontrol edildi. Bu kontroller yapılırken CAE virusunun tüm dünyada kullanılan CAEV-CO suşu referans suş olarak kullanıldı ve Gen Bankasında yer alan diğer CAE virusları ile değişik oranlarda eşleştiği görüldü.

Çizelge 3.5. Araştırmada elde edilen kısmi CAEV-gag nükleotid dizinlerinin adı (orijini) ve Gen Bankası kayıt numaraları

İşletme Kodu	Dizin Adı	Gen Bankası Kayıt Numarası
A	L-114 (Lökosit)	HM534737
A	LS-105 (Süt)	HM534738
A	LS-107 (Süt)	HM534739
A	L-107 (Lökosit)	HM534740
E	BUS-27 (Süt)	HM534741



Şekil 3.2. Analiz edilen CAEV dizinlerinin kendi aralarında çoklu hizalanması



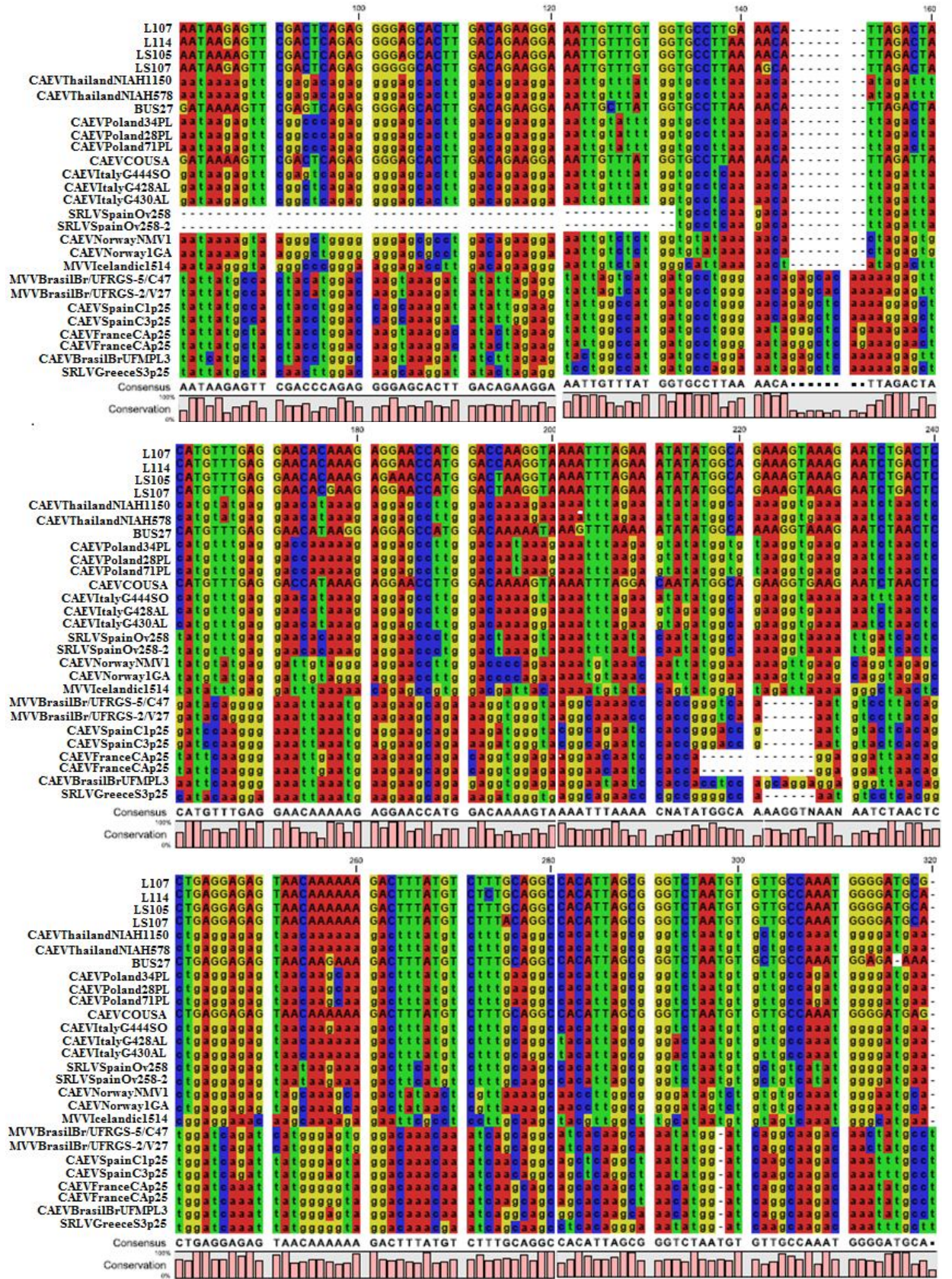
Şekil 3.2' in devamı

Sahadan elde edilen virus klonlarının kendi aralarında çoklu hizalanması sonucunda BUS27 dizini ayrı bir sürüden elde edilmiş olması nedeniyle diğer dizinlerden daha fazla farklılık gösterdi ve dizinin 369. baz düzeyinde delesyonların şekillenmiş olduğu belirlendi (Şekil 3.2). Ayrıca baz düzeyinde Gen Bankasında yer alan farklı ülkelerden elde edilmiş olan suşlarla yerel saha suşlarına ait dizinler

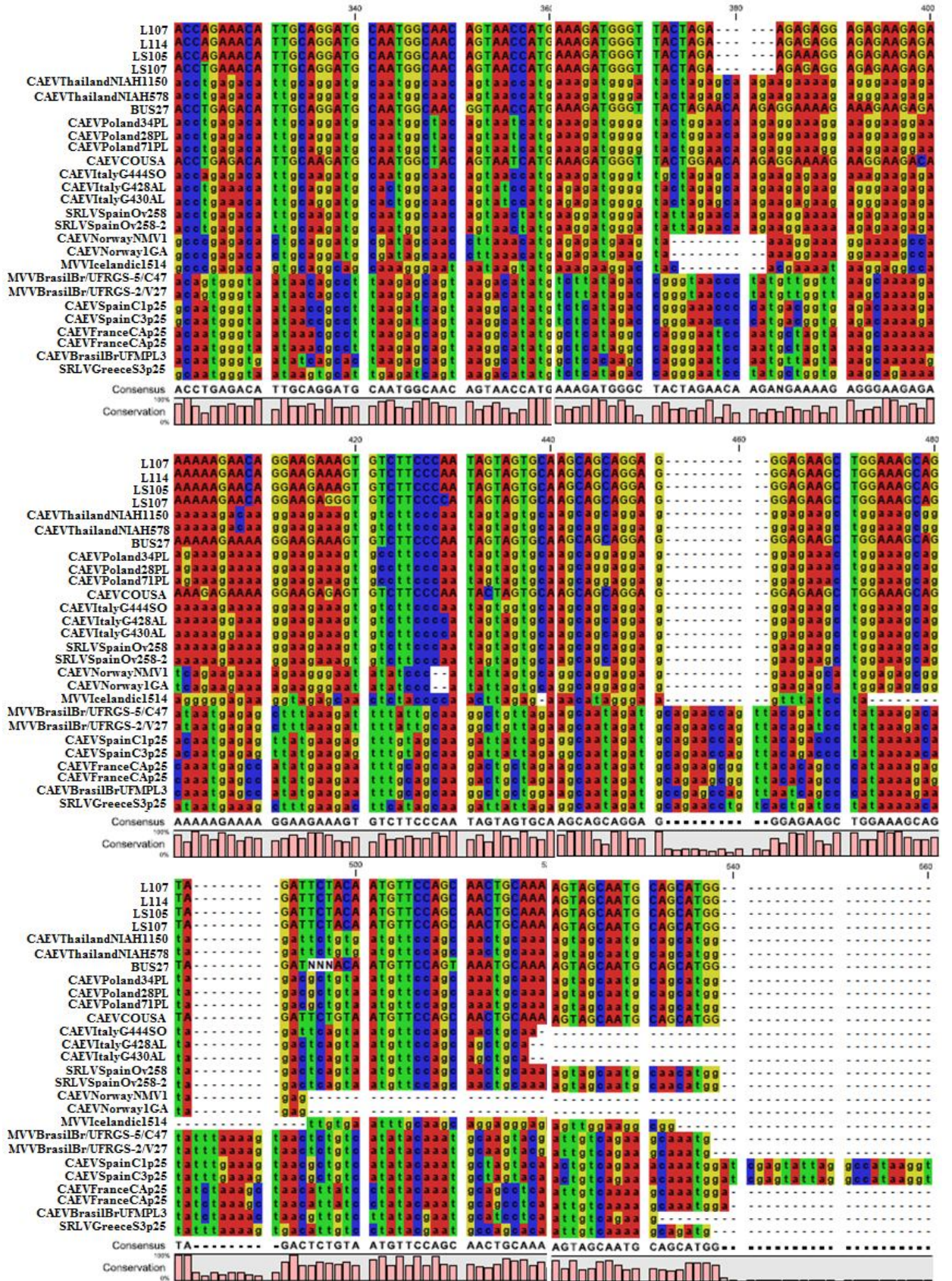
karşılaştırmalı olarak değerlendirildi (Şekil 3.3). Gen Bankasından elde edilen referans virusların orjinleri ve Gen Bankası kayıt numaraları Çizelge 3.6’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Gen Bankasından elde edilen referans virusların orjinleri ve Gen Bankası kayıt numaraları

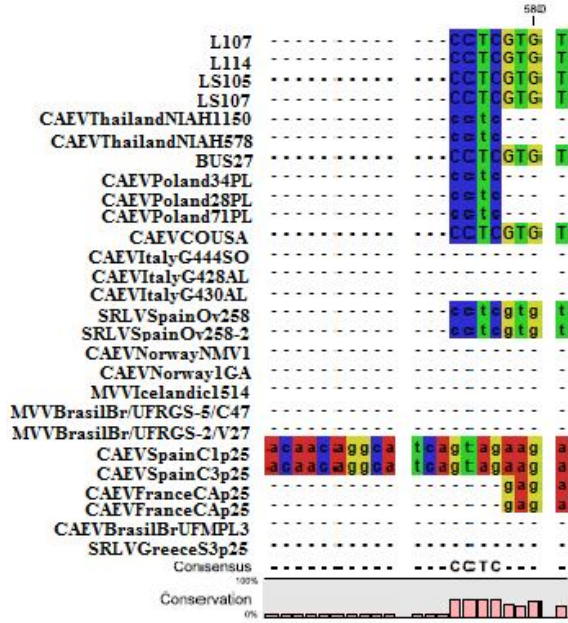
Dizin Adı	Gen Bankası Kayıt Numarası	Ülke	Genom
CAEV-CO	M33677	Amerika	Komple genom
34PL	DQ456485	Polonya	Kısmi dizin
28PL	DQ456484	Polonya	Kısmi dizin
71PL	DQ456483	Polonya	Kısmi dizin
CAEV-1GA	AF322109	Norveç	Komple genom
CAEV-NMV1	L78453	Norveç	Kısmi dizin
MVV-1514	M60610	İzlanda	Komple genom
SRLV-Ov258	FJ187812	İspanya	Kısmi dizin
SRLV-Ov258-2	FJ187811	İspanya	Kısmi dizin
C3p25	DQ632735	İspanya	Kısmi dizin
C1P25	DQ632734	İspanya	Kısmi dizin
G444SO	DQ190051	İtalya	Kısmi dizin
G428AL	DQ190038	İtalya	Kısmi dizin
G430AL	DQ190037	İtalya	Kısmi dizin
NIAH1150	GQ161215	Tayland	Kısmi dizin
NIAH578	GQ161214	Tayland	Kısmi dizin
Br/UFRGS-2/V27	AJ305039	Brezilya	Kısmi dizin
Br/UFRGS-5/C47	AJ305041	Brezilya	Kısmi dizin
Br/UFMGPL3	AY101348	Brezilya	Kısmi dizin
CAP25	AF015181	Fransa	Kısmi dizin
S3p25	AY530291	Yunanistan	Kısmi dizin



Şekil 3.3. CAEV saha virusları gag gen bölgesi dizinlerinin referans dizinler ile karşılaştırılması

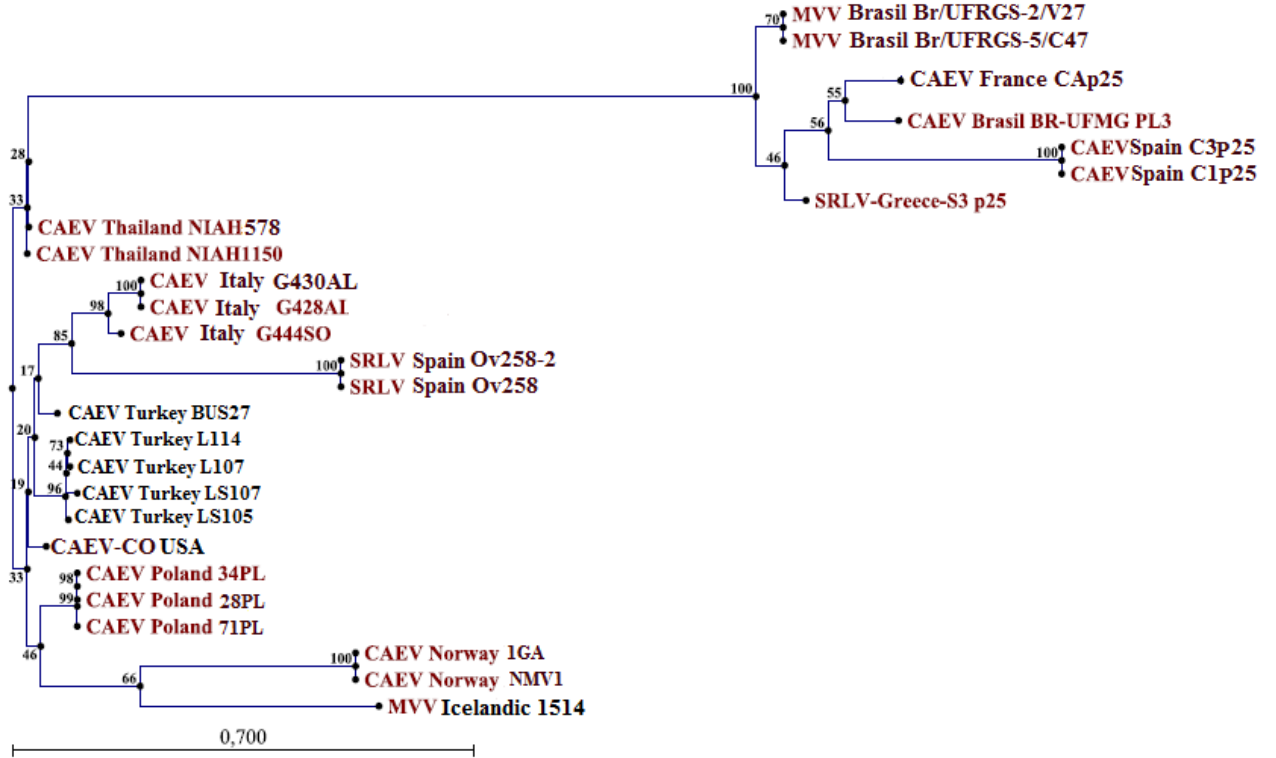


Şekil 3.3'ün devamı



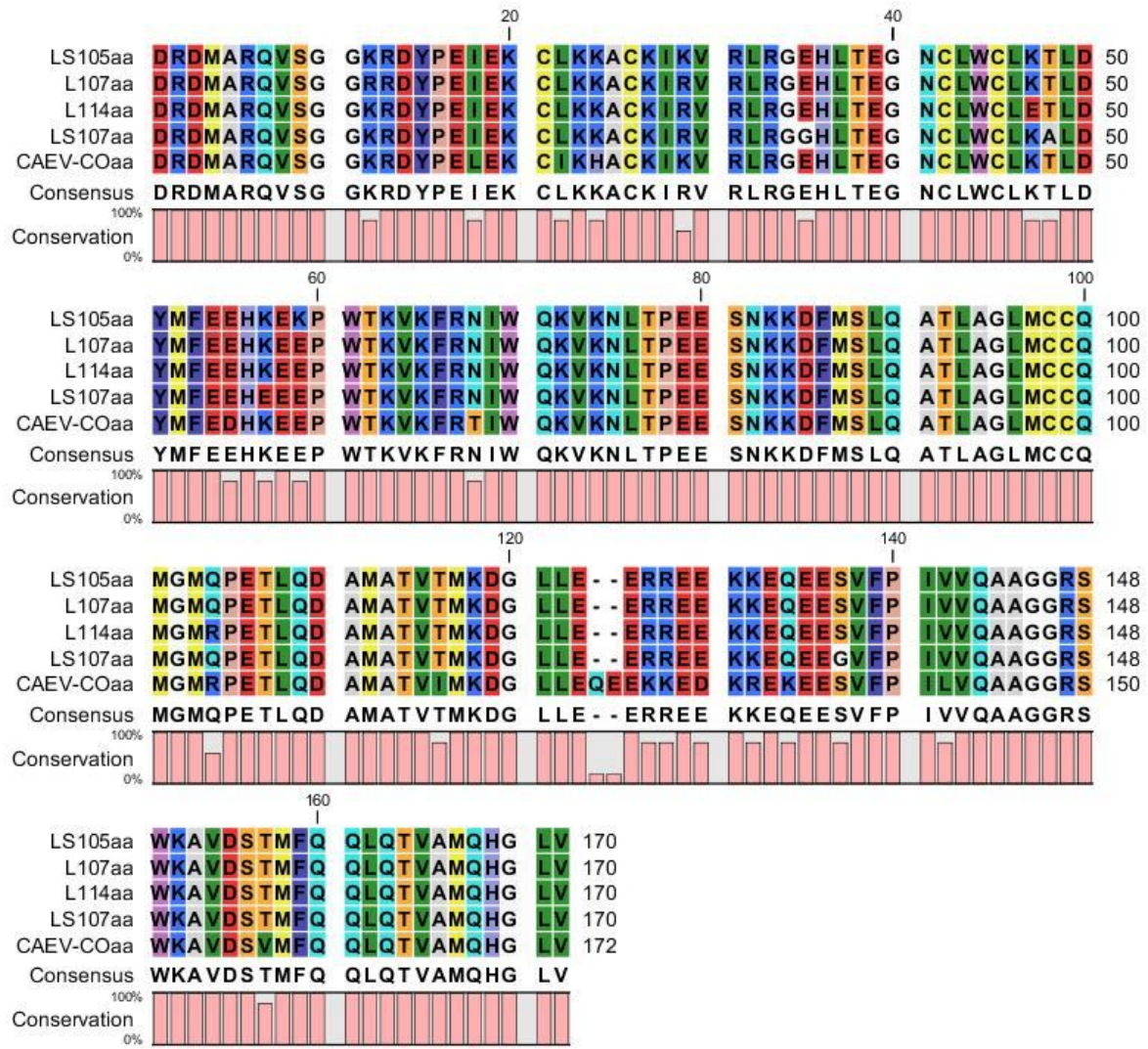
Şekil 3.3'ün devamı

Çalışmada elde edilen saha viruslarının Gen Bankasından sağlanan referans suşlarla gag gen düzeyinde karşılaştırmaları yapılmış olup, nükleotit düzeyinde benzerlik oranları Şekil 3.3' te gösterildi. Elde edilen gag dizinlerinin çoklu karşılaştırmasında genin bazı bölgelerinde dizinler arasında görülen nükleotit farklılıklarının yanısıra, dizinlerin belli bölgelerinde delesyonların varlığı saptandı. Bu noktada yapılan değerlendirmelerde 144., 378., 452. ve 483. baz düzeylerinde başlayan, yaklaşık 10 baz kadar devam eden delesyonların İtalya, Polonya, Norveç ve İzlanda CAEV suşları ve İspanya SRLV suşları yanında CAEV-CO (Amerika) referans suşu ile benzerlik gösterdiği belirlendi.



Şekil 3.4. Çalışmada elde edilen CAEV gag geni dizinlerinin Gen Bankasında sağlanan CAEV, MVV ve SRLV dizinleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik harita

Çalışmada elde edilen gag geni dizinlerinin kendi aralarında ve Gen Bankasından elde edilen referans CAEV, MVV ve SRLV virusları kullanılarak karşılaştırılması ile filogenetik harita yapıldı (Şekil 3.4). Oluşturulan filogenetik haritada A işletmesinden elde edilen örneklerin dizinleri kendi aralarında bir dal oluştururken, E işletmesinden elde edilen örneğin dizininin ayrı bir dal oluşturduğu belirlendi. Elde edilen saha viruslarının ülkemizin bulunduğu coğrafyada bildirilen diğer CAEV ve SRLV viruslarına kısmi gag gen düzeyinde filogenetik olarak yakın bulunduğu belirlendi.



Şekil 3.5. Araştırmada elde edilen kısmi CAEV-gag geni dizinlerinin kendi aralarında aminoasit düzeyinde çoklu hizalanmaları

Çalışmada elde edilen saha viruslarına ait gag geni kısmi dizinlerinin translasyonu ile elde edilen aminoasitler karşılaştırıldığında, LS-107 virusunun aynı sürüde tespit edilen diğer viruslardan farklı olduğu görüldü. Bu virusta gözlenen aminoasit değişimlerinin genellikle hidrofilik aminoasitten yine bir hidrofilik aminoasite dönüşüm şeklinde olduğu, ancak aminoasit diziliminde 48. sırada hidrofilik (T-Threonine) bir aminoasitin hidrofobik (A-Alanine) aminoasite dönüşmüş olduğu belirlendi (Şekil 3.5).

4. TARTIŞMA

CAEV enfeksiyonu keçilerde immunsupresyon ve uzun bir inkubasyon periyodundan sonra latent enfeksiyon oluşumu ile karakterize olan bir hastalık tablosu oluşturmaktadır. CAEV ilk defa artrititis semptomları gösteren bir keçinin ekleminden ve aynı zamanda encephalitisli bir oğlağın beyninden izole edilmiştir (Crawford ve ark., 1980, Narayan ve ark., 1980).

1990 yılında virus genomu klonlandıktan sonra tüm genom sekansı çıkartılarak, viral proteinleri kodlayan genlerin karakteri belirlenmiştir (Saltarelli ve ark., 1990). Bu tarihten günümüze kadar eradikasyon programı uygulayan Avrupa ülkelerinde ve Amerika’da sirküle olan virusun tespiti amacıyla moleküler çalışmalar sürdürülmüştür. Türkiye’de ise ilk defa bu çalışma ile ülkemizde bulunan saha suşlarının genetik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada İç Anadolu, Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde yer alan 6 ilde bulunan 8 adet keçi yetiştiriciliği işletmesindeki hayvanlardan sağlanan 435 adet kan örneği ve 285 adet süt örneği ELISA ile CAEV spesifik antikorlar yönünden kontrol edilerek, enfeksiyonun seroepidemiolojisi ve süt örneklerinin tanıda kullanılabilirliği incelenmiştir. ELISA ile seropozitif ve seronegatif olarak belirlenen hayvanlar arasından seçilen 70 adet kan ve 16 adet süt örneği nested PCR ile test edilerek, enfeksiyonun tanısında PCR’ın kullanım olanağı değerlendirilmiş; ayrıca yerel suşların moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Türkiye’de CAE virus enfeksiyonunun varlığı/yaygınlığına ilgili çalışmalar (Burgu ve ark., 1994; Yavru ve ark., 2001; Çimtay ve ark., 2004; Aslantaş ve ark., 2005) değerlendirildiğinde belirlenen enfeksiyon oranlarının %1,03-6 arasında değiştiği görülmektedir. Bildirilen çalışmalar her ne kadar bir ya da birkaç ilde ve sınırlı sayıda hayvan popülasyonu örneklenerek gerçekleştirilmiş ise de, elde edilen veriler bir bütün olarak ele alındığında Türkiye’de farklı yerleşim birimlerinde ve işletme tipinde (kamu işletmesi, küçük aile işletmesi, vb) yetiştirilen keçilerde enfeksiyonun varlığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmada Ankara, Eskişehir, Kütahya, Antalya, Burdur ve Kırklareli illerinde yerleşik 8 işletmede yetiştirilen keçilerde %8,5 (37/435) oranında seropozitiflik belirlenmiştir.

CAEV seropozitiflik oranları değerlendirilirken retrovirusların replikasyon özellikleri ve enfeksiyonun patogeneğinde, tanısı ve kontrol programı uygulamaları yönünden önem taşıyan bazı bilimsel veriler göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin; lentivirus

enfeksiyonlarında reverse transcriptaz enzimi ile RNA'nın DNA'ya dönüşümü sırasında oluşan mutant genotiplerin immun sistem tarafından tanınmaması ve bu nedenle konakçının nötralizan antikor oluşturmaması mümkündür (Burgu ve ark., 1990; De Andres ve ark., 2005; Brinkhof ve ark., 2010). Bundan başka halen agar jel immunodifüzyon testi yanısıra CAEV enfeksiyonun serolojik tanısında sıklıkla kullanılan ELISA kitlerinin hazırlanma protokolleri de serolojik çalışmalarda değer taşımaktadır (De Andres ve ark., 2005). Bu noktada pahalı olmasına karşın, rekombinant zar proteinleri ve sentetik transmembran proteinleri kullanılarak hazırlanan ELISA kitlerinin duyarlık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle tercih edilmesi önerilmektedir. Eradikasyon programı uygulanan ülkelerde söz konusu kitler, çoklu (pool) örnekler için kullanılarak, daha ekonomik uygulamalar gerçekleştirilmektedir (Brinkhof ve ark., 2006). Bu çalışmada viral kapsit içinde yer alan p28 spesifik antikorlar ile kaplanmış ELISA kitleri kullanılarak, test verilerinin güvenilirliği temin edilmiştir. Bu bilgilerden özetle Türkiye'de bildirilen çalışmalarda (Burgu ve ark., 1994; Yavru ve ark., 2001; Çimtay ve ark., 2004; Aslantaş ve ark., 2005) örneklenen populasyon, örnekleme zamanı, tanı yöntemi farklılıkları bulunmakla birlikte, bu çalışmada belirlenen seropozitiflik oranının CAEV enfeksiyonuna ilgili olarak Türkiye'de bildirilen oranlara benzer bulunmuş olması, enfeksiyonun ülke sathında belirli oranda varlığını sürdürdüğünün bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Enfeksiyonun yaygınlığı, etçi ırk ve tiftik keçilerinde düşük olmasına karşın, sütçü keçi ırklarında oldukça yüksektir. Keçi sütü üretimi yapılan işletmelerde enfeksiyon, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Zira; CAEV ile enfekte dişilerin süt üretim miktarının, enfekte olmayanlara göre %25 oranında daha düşük olduğu bildirilmiştir (Smith ve Sherman, 1994). Çalışmada örneklenmiş olan 435 adet keçiden 180 adedi sütçü Saanen ırkı 255 adedi Tiftik keçisidir. Saanen ırkı keçilerde %15,0 (27/180) oranında seropozitiflik belirlenirken, diğerlerinde %3,9 (10/255) oranında seropozitiflik belirlenmiş olup, iki ırk için saptanan seropozitiflik oranları ki-kare analizi ile değerlendirildiğinde, oranlar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).

Enfeksiyonların tanısında kan örneklerinin sağlanmasının zaman alan ve hekim tarafından yapılan bir uygulama olması nedeniyle, örneklenmesi daha kolay olan bireysel süt örneklerinin kullanımı ya da tank sütlerinin kullanımı son yıllarda tercih edilmekte olup, özellikle ELISA uygulamalarında süt örneklerine ilgili bilimsel ve saha çalışmaları yapılmaktadır. Bu bağlamda bu çalışmada 285 keçiden sağlanan kan örnekleri yanı sıra süt

serumu örneklerine de ELISA uygulanmış ve %4,9 (14/285) oranında seropozitiflik belirlenmiştir. Diğer yandan sözkonusu 285 keçiye ait kan örneklerinin ELISA ile CAEV antikorları yönünden yapılan kontrolünde seropozitiflik oranı %10,5 (30/285) olarak belirlenmiştir. Bu veriler süt örneklerinin bir sürüde enfeksiyonun varlığının araştırılması için kullanılabilirliğinin olduğunu, bununla birlikte seropozitif hayvanların sürüden ayrılması esasına dayanan kontrol programlarında tercih edilmemesi gereğini ortaya koymuştur. Bu noktada CAEV enfeksiyonlarında yavrulama döneminde gelişen immunsupresyona bağlı olarak süt epitel hücrelerinde viral replikasyonun artışı ve antikor miktarının azalması yönündeki bildirimler (Chebloune ve ark., 1996c; Peterhans ve ark., 1999; Reina ve ark.,2006) dikkate alındığında sütün örneklenme zamanına bağlı olarak tanısal niteliğinde farklılıklar olabileceğini, ayrıca sağmal dönemde olmayan ya da erkek hayvanlardan süt örneği sağlanamayacağını da hatırla bulundurmakta yarar vardır.

CAEV enfeksiyonun tanı materyali olarak kullanılması yanı sıra özellikle enfeksiyonun nakli bakımından süt önem taşımaktadır. Keçilerin uzun dönem CAEV enfeksiyonlarında meme bezi virusun üremesi için hedef organ olup, en fazla viral yük sütte ve meme bezinde bulunmaktadır (Ravazzollo ve ark., 2006). Meme dokusu epitel hücreleri ve makrofajlar virusun barındığı hücre tipleridir (Carroza ve ark., 2003). Bu çalışmada nested PCR uygulanan 16 adet süt örneğinden 8 (%50,0) adedinde CAEV nükleik asidi tespit edilmiştir. Her ne kadar bu sütler ile beslenen oğlaklarda enfeksiyon gelişimini izlemek bu çalışmada mümkün olamamış ise de, birçok araştırmada (Kennedy-Stoskopf ve ark., 1985; Rowe ve East.,1997; Leitner ve ark., 2010) bildirildiği üzere enfekte makrofaj ve epitel hücrelerini içeren sütle beslenen oğlaklarda enfeksiyon olasılığının yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Nitekim birçok araştırmacı (Leitner ve ark., 2010; Ellis ve ark., 1983) enfekte hayvanların yenidoğanlarda enfeksiyon kaynağı olduğunu ve enfekte süt aracılı anne-yavru ilişkisi nedeniyle sürü içinde enfekte ailelerin oluştuğunu (Nord ve Adnoy, 1997) bildirmiştir.

Bu çalışmada kan örneklerinin tanı materyali olarak kullanıldığı nested PCR uygulamalarının enfeksiyonun teşhisinde kullanımını değerlendirmek amacıyla, CAEV enfeksiyonu varlığının ELISA ile belirlendiği işletmelerde bulunan 70 keçiden sağlanan kan örneği CAEV nükleik asidi yönünden nested PCR ile test edilmiş olup, sonuçlar ELISA ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 3.7’de sunulan veriler incelendiğinde, ELISA ile belirlenen CAEV enfeksiyonu pozitiflik oranının daha yüksek olduğu, örneklenen

işletmeler bazında ELISA ya da PCR yönünden artan pozitiflik oranlarının saptandığı görölmektedir. Bu verilerin oluşmasında muhtemelen örneklenen hayvanların yaşı, sürüye enfeksiyonun girişi üzerinden geçen süre, antijenik çeşitlilik ve latent enfeksiyon nedeni ile geç serokonversiyon oluşumunun antikor saptanması esasına dayalı testler için duyarlılığı düşürüyor olmasının (Gil ve ark., 2006, Ellis ve ark., 1983) rolü bulunmaktadır. Bundan başka sürekli kanda yüksek titrede bulunan immunsupresif retrovirusların aksine, CAE virusunun tespiti oldukça zor olmaktadır. Serokonversiyon öncesinde PCR teknikleri tespitte daha duyarlı iken, serokonversiyon oluşumu sonrasında viral yükün az olması nedeniyle enfeksiyonun tespitinde serolojik tekniklerin PCR testlerine oranla daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Eltahir ve ark., 2006). Serokonversiyonu takiben CAE virusun monositlerde proviral DNA olarak hiçbir enfeksiyöz partikül üretmeden latent olarak kalabiliyor olması, bu dönemde viral nükleik asit tespitini olanaksız kılar. Monositlerin makrofajlara farklılaşması viral replikasyon için ön koşul olup, stres, gebelik, immunsupresyon durumlarında viral reaktivasyon gerçekleşir ve 1 hafta 10 günlük bir süre için virus belirlenebilir titreye ulaşır (Chebloune ve ark., 1996b).

Bilindiğı üzere lentiviruslar RNA'ya bağı DNA polimeraz (Reverse transcriptase) enzimine sahiptirler ve bu enzim ile sitoplazmada tek iplikçikli RNA genomunu DNA'ya transkribe ederek konağın enfeksiyonuna neden olmaktadırlar (Burgu ve ark., 1990; Granoff ve Webster, 1999). Mutasyonların büyük bir kısmı, viral replikasyonunun; RNA polimeraz tarafından proviral transkripsiyonun gerçekleştirilmesi, viral reverse transkriptase ile tek iplikçikli viral DNA oluşumu ve bu genomun çift iplikçikli DNA'ya sentezlenmesi aşamalarında meydana gelmektedir ve genellikle antijenik drift olarak ortaya çıkmaktadır (Kim ve ark., 1996). Böylece CAEV ile enfekte olan bir hayvanda virusun yüzlerce farklı genotipi bulunmaktadır. Ortaya çıkan mutant genotipler immunsistemden kaçabilmekte iken, bunlardan ancak 1-2 genotip immun sistem tarafından kontrol edilebilmektedir. Bu nedenle seronegatif olarak belirlenen hayvanların ancak PCR ile pozitif olarak tespit edilebilmesi mümkün olabilmektedir (Brinkhof ve ark., 2008). Bu bilgilerden özetle, viral nükleik asit ve virus spesifik antikorların saptanması gibi farklı hedefleri olan ELISA ve Nested PCR tekniklerinin tanısal değerlerini karşılaştırmaktan uzak bir yaklaşımla, amaca ve epidemiyolojik verilere dayanılarak uygun yöntemin/yöntemlerin seçiminin yapılması gerektiğini vurgulamakta yarar bulunmaktadır. Nitekim Gil ve ark., (2006) serokonversiyonun gelişmediğı durumlarda enfekte olan hayvanlarda proviral nükleik asitin belirlenmesi için PCR testlerinin yapılmasının yararlı olduğunu bildirirken, sürüde enfeksiyonun varlığı ve

kontrol programlarının izlenmesinde ELISA kullanımını öneren birçok araştırmacı (Rimstad ve ark.,1993; Reina ve ark., 2009) bulunmaktadır.

Bu çalışmada CAEV ile enfekte 5 keçiye ait 3 adet kan örneği ve 2 adet süt örneğinden sağlanan CAEV spesifik ürünlere, klonlamayı takiben dizin analizi yapılmış ve yerel suşların gag gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gag dizinlerinin Gen Bankasından sağlanan referans suşlarla yapılan çoklu karşılaştırmasında genin bazı bölgelerinde dizinler arasında görülen nükleotit farklılıklarının yanı sıra, dizinlerin belli bölgelerinde delesyonların varlığı dikkati çekmiş olup, bu noktada yapılan değerlendirmelerde belirtilen bölgelerde oluşan delesyonların İtalya, Polonya, Norveç ve İzlanda CAEV suşları ve İspanya SRLV suşları yanında CAEV-CO (Amerika) referans suşu ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 3.4’de de sunulduğu gibi, bu çalışmada analiz edilen yerel saha suşlarına ait dizinler kendi aralarında yakın bulunurken, ülkemizin bulunduğu coğrafyada bildirilen diğer CAEV ve SRLV viruslarına da filogenetik olarak benzer bulunmuştur. Bilindiği üzere SRLV’ların yapısal proteinlerinde yer alan başlıca epitoplarda kolaylıkla antigenik çeşitlilik meydana gelebilmektedir (Grego ve ark., 2009). Fransa’dan ve Kuzey Amerika’dan elde edilen saha izolatları CAEV-CO orijin suşu ile karşılaştırıldığında pol ve gag gen bölgelerinin mutasyonlara karşı korunduğu, env gen bölgesinde ise genetik farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir. (Pisoni ve ark., 2006, Kuzmak ve ark., 2007) Bu çalışmada yerel suşlarda ilgili gag gen bölgesinin incelenmesi tercih edilmiştir. Araştırmada incelenen saha viruslarına ait gag geni kısmi dizinlerinin translasyonu ile elde edilen aminoasitler karşılaştırıldığında, LS-107 virusunun aynı sürüde tespit edilen diğer viruslardan farklı olduğu ve aminoasit değişimlerinin bulunduğu belirlenmiş olup, aminoasit diziliminde 48.sırada hidrofilik (T-Threonine) bir aminoasitin hidrofobik (A-Alanine) aminoasite dönüşmüş olduğu belirlenmiştir. Bu değişim; söz konusu bölgenin konformasyonel yapısında değişime neden olabileceği ve aynı sürüde bulunan enfekte hayvanlar arasında virusun farklı antijenik tiplerinin bulunabileceği olasılığını akla getirmektedir.

Keçi sütü diğer sütlere oranla vitamin A, fosfor, magnezyum ve selenyum miktarı açısından insan sütüne en yakın olan süt olup, inflamasyon oluşumunu önleyici yağ asitlerini içermektedir. Yağ küreciklerinin çapının çok küçük olması nedeni ile homojenize haldedir ve sindirimi kolaydır. İçerdiği aminoasit kombinasyonu farklı olup, astım, alerji, sindirim ve solunum sistemi rahatsızlıkları, deri hastalıkları gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisinde

kullanılmaktadır (Haenlein, 2004). Son yıllarda ülkemizde de ticari olarak sunulmaya başlanılan keçi sütünün ve keçi yetiştiriciliğinin ekonomik önemi dikkate alınmalıdır. Türkiye’de CAEV enfeksiyonunun seropozitifliği, yapılan çalışmalarda diğer Avrupa ve Amerika ülkelerinin aksine düşük (İsviçre ve Meksika ile benzer oranda bulunmuştur) oranlarda belirlenmiş olmasına rağmen, ülkemizde enfeksiyonun varlığı kesin olup, enfeksiyonun mücadelesinde bir eradikasyon programı uygulanmamaktadır. Gıda teknolojilerinin gelişmesi, bilinçli beslenme alışkanlıklarının kazanılması ve keçi sütünün özelliklerinin farkına varılması ile ülkemizde de gelişmiş ülkelerde olduğu gibi keçi sütü tüketiminin zamanla artacak olması, Türkiye’de CAEV enfeksiyonunun kontrol ve mücadelesini gerekli kılacağını akla getirmektedir. Yapılan bu çalışma ile ülkemizde varlığı daha önce de serolojik olarak ortaya konmuş olan, keçi yetiştiriciliğinde önemli bir yeri bulunan bu enfeksiyona ait, moleküler olarak da desteklenmiş olan güncel serolojik veriler elde edilmiş olup, bu verilerin yeni çalışmalarda ve geliştirilebilecek mücadele programlarında önem arz edeceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada ülkemizde CAEV enfeksiyonuna ilişkin güncel veriler elde edilmiş olup, kan ve süt örnekleri kullanılarak enfeksiyonun tanısı için ELISA ve PCR testlerinin uygulanabileceği ve ülkemizde sirküle olan virusun gag gen bölgesi kullanılarak genetik karakterizasyonu ortaya konulmuştur.

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

- Ülkemizde ilk olarak tespit edildiği 1994 yılından bu yana varlığı bilinen CAEV enfeksiyonunun halen farklı coğrafya ve işletme tipleri için yaygın düzeyde varlığı,
- Keçi sütünün özellikle işletmede enfeksiyonun varlığının araştırılması amacıyla kullanılabileceği, bireysel değerlendirmeler için kan örneklerinin üstünlüğünün bulunduğu,
- Virusun sahip olduğu enzimleri, replikasyon siklusu ve patogenezi dikkate alındığında PCR tekniği ile viral nükleik asit varlığının tespiti zor olmakla birlikte, bu tekniğin enfeksiyonun tanısında amaca uygun olarak, tek başına kullanılması yerine ELISA ile koordineli olarak kullanılması gerektiği,
- Saha viruslarının moleküler karakteri gag geni düzeyinde incelendiğinde ülkemizin bulunduğu coğrafi bölgede bildirilen diğer SRLV viruslarına filogenetik olarak yakın olduğu,
- CAEV enfeksiyonuna karşı tüm keçi ırklarının duyarlı olması ile birlikte, enfeksiyonun özellikle sütçü keçi ırklarında daha yaygın olduğu ve ekonomik kayıplara yol açtığı bilgisine paralel olarak, bu çalışmada da sütçü keçi ırkı olarak tanımlanan Saanen keçilerinde Tiftik keçilerine göre enfeksiyon oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlardan hareketle,

- Enfeksiyonun serokonversiyon fazı sonrasında viral yük azaldığı için PCR tekniğinin ELISA tekniklerine göre duyarlılığının az olması, ancak serokonversiyon öncesinde PCR tekniği ile nükleik asit tespit edilebilmesine bağlı olarak virolojik tekniklerin serolojik testlerle kombine edilerek enfeksiyonun tanısında kullanılması,
- Bu çalışmada elde edilen CAEV saha suşlarına ilgili moleküler bilgiler, bu suşların gerek kendi aralarında ve gerekse bulunduğumuz coğrafyada saptanan suşlar ile önemli düzeyde benzerliğini ortaya koymuştur. CAEV saha suşlarına ilgili elde edilen bilgilerin ilk moleküler karakterizasyon verileri olması ile bu konuya ilişkin yapılacak yeni çalışmalara kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Bu bağlamda farklı yaş, ırk, yetiştirme şekli vb. özelliklere sahip daha geniş popülasyon kullanılarak moleküler karakterizasyon çalışmalarının yapılması,
- CAE virusu ve MV virusu morfolojik ve fizyolojik olarak farklı olmalarına rağmen her iki virusun genotiplerinin koyun ve keçilerde tespit edilebilmesi nedeniyle özellikle bir arada bulunan sürüler de göz önüne alınarak, planlanacak eradikasyon programlarının her iki enfeksiyonu da kapsamalarının gerektiğinin unutulmaması,
- Birçok ülkede (Fransa, İtalya, İspanya, Almanya bu ülkelerden bazılarıdır) hayvanların sağlığı ve refahı için bir risk faktörü olan CAEV enfeksiyonu kontrol ve eradikasyon programının halen uygulanmakta olduğu, dünyanın gelişmiş ülkelerindeki işletmelerde genç hayvanların süt tankından ortak olarak beslenmesi nedeniyle, hastalığın yüksek oranda (%80) görülmesine karşın, gelişmekte olan ülkelerde bulunan işletmelerde bu oranın daha düşük olduğu (%10) (Sherman ve Paul, 1992) bildirilmektedir. Ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı TÜGEM tarafından yürütülmekte olan projeler içerisinde keçi yetiştiriciliğinin desteklenmesinin de yer alması, bu bağlamda birçok yeni keçi yetiştiriciliği işletmesinin oluşabileceği de dikkate alınarak, halen enfeksiyonun seroprevalansının çok yüksek olmaması avantajı da değerlendirilerek CAEV kontrol ve eradikasyon programı uygulamasının biran önce başlatılması önerilmektedir.

ÖZET

Keçilerde Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) Enfeksiyonunun Kan ve Süt Örneklerinde ELISA ve PCR Teknikleri ile Tanısı ve Yerel Virusların Moleküler Karakterizasyonu

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde bulunan keçilerde, kan ve süt örneklerinde ELISA ve PCR teknikleri kullanılarak CAEV enfeksiyonunun varlığının belirlenmesi ve yerel virusların moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlandı. İç Anadolu, Ege, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde yer alan 6 ilde (Ankara, Eskişehir, Kütahya, Antalya, Burdur, Kırklareli) bulunan 8 adet keçi yetiştiriciliği işletmesinden klinik olarak enfeksiyon belirtisi göstermeyen keçilerden 435 adet kan örneği ve aynı hayvanların 285 adedinden aynı zamanda süt örneği temin edilerek, tez materyali olarak kullanıldı. Elde edilen kan ve süt serumlarının tümü ELISA ile CAE virusuna karşı oluşan antikorlar yönünden incelendi. 70 adet kan örneği ve 16 adet süt örneğine CAE virusu nükleik asit tespiti amacıyla gag bölgesine spesifik primerler kullanılarak nested PCR testi uygulandı.

Araştırmada örneklenen 435 adet kan serumu örneğinden 37(% 8,5) adedi, 285 adet süt serumu örneğinden 14 (% 4,9) adedi ELISA ile pozitif olarak belirlendi. Seçilen 70 adet lökosit örneğinden 14 adedi, 16 adet süt örneğinden 8 adedi nested PCR tekniği ile pozitif olarak belirlendi. PCR testleri ile pozitif olarak belirlenen saha örneklerinden 2 adet kan örneği ve 3 adet süt örneği plazmid içinde klonlanarak virusun gag gen bölgesi dizinleri analiz edildi. Elde edilen dizin analizi sonuçları kendi aralarında benzerlik gösterirken, ülkemizin bulunduğu coğrafyada bildirilen diğer CAEV ve SRLV viruslarına kısmi gag geni düzeyinde filogenetik olarak yakın bulundu.

Çalışmada CAEV enfeksiyonunun tespit edilebilirliğinde ELISA tekniklerinin düzenli aralıklarla kullanılması, PCR testinin enfeksiyonun tespiti yerine sirküle olan virusun moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla kullanılması gerektiği sonucuna varıldı. CAEV enfeksiyonunun tanısında süt örneklerinin önemli olduğu ve enfeksiyonun teşhisinde kullanılabileceği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: CAEV, ELISA, PCR, gag, tanı

SUMMARY

The Diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) Infection in Blood and Milk Samples from Goats by ELISA and PCR and, Molecular Characterization of Local Viruses.

In this study, it was aimed to determine the presence of CAEV infection in the blood and milk samples of goats collected from various regions of Turkey using ELISA and PCR techniques and molecular characterization of local viruses. By collecting 435 blood samples and 285 milk samples from the goats from 8 goat products company in 6 provinces (Ankara, Eskişehir, Kütahya, Antalya, Burdur, Kırklareli) in Middle Anatolia, Aegean, Mediterranean and Marmara Regions of Turkey, they were used as thesis material. All of the blood and serum samples collected were examined in terms of antibodies against ELISA and CAE viruses. 70 pieces of blood samples and 16 milk samples were applied nested PCR test using specific primaries in gag region to detect CAE virus nucleic acid.

37 (% 8,5) of the 435 blood samples used in the study and 14 (% 4.9) of the 285 milk samples were determined to be positive by ELISA. 14 of the selected 70 leucocyte samples and 8 of the selected 16 milk samples were determined to be positive by PCR technique. 2 blood samples and 3 milk samples determined to be positive with PCR tests in the field were cloned in plasmid and gag gene region sequence of the virus was analysed. The results of the sequence analysis were similar among themselves, they were found to be similar phylogenetically to CAEV and SRLV viruses in terms of partial gag gene level declared in the geography of our country.

In the study, in the determinability of CAEV infection using the ELISA techniques with certain intervals has been determined to be necessary for the determination of the molecular characterization of the virus circulated instead of detecting PCR test infection. It has been concluded that milk samples are important for the detection of CAEV infection and can be used in the diagnosis of the infection.

Key Words: CAEV, ELISA, PCR, gag, detection

KAYNAKLAR

- ADAMS DS, KLEVJER-ANDERSON P, CARLSON JL, MCGUIRE TC, GORHAM JR. (1983). Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* **44**: 1670-1675.
- ADAMS D.S., OLIVER R.E., AMEGHINO E., DEMARTINI J.C., VERWOERD D.W., HOUWERS D.J., WAGHELA S., GORHAM J.R., HYLLSETH B., DAWSON M., TRIGO F.J., MCGUIRE T.C.(1984). Global survey of serological evidence of caprine arthritis- encephalitis virus infection. *Vet Rec.* **115**:493-495.
- ALI AL AHMAD M.Z., FIENI F., PELLERIN J.L., GUIGUEN F., CHEREL Y., CHATAGNON G., BOUZAR A.B., CHEBLOUNE Y. (2008a). Detection of viral genomes of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology.* **69**: 473-480.
- ALI AL AHMAD M.Z., CHEBLOUNE Y., BOUZAR A.B., BARIL G., BOUVIER F., CHATAGNON G., LEBOEUF B., PEPIN M., GUIBERT J.M., RUSSO P., MANFREDI E., MARTIN J., FIENI F. (2008b).Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. *Theriogenology.* **69**: 408-415. ,
- ASLANTAŞ O., ÖZYÖRÜK F., PINAR D., GÜNGÖR B.(2005). Serological survey for caprine arthritis- encephalitis virus in Damascus and Kilis goats in Hatay, Tukey. *Revue Med. Vet.* **156**: 402-404.
- BERGONIER D., DE CREMOUX R., RUPP R., LAGRIFOULL G., BERTHELOT X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* **34**: 689-716.
- BLACKLAWS B.A., BERRIATUA E.,TORSTEINSDOTTIR S., WATT N.J., ANDRES D., KLEIN D., HARKISS G.D. (2004). Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* **101**: 199-208.
- BOUZAR B.A., REA A., HOC-VILLET S., GARNIER C., GUIGEN F., JIN Y., NARAYAN O., CHEBLOUNE Y.(2007). Activation/ proliferation and apoptosisof bystander goat lymphocytes induced by a macrophage-tropic chimeric caprine arthritis encephalitis virus expressing SIV Nef. *Virology.***364**: 269-280.
- BRINKHOF J.M.A., HOUWERS D.J., MOLL L., DERCKSEN D., VAN MAANEN C. (2010). Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* **142**: 193–198.
- BRINKHOF, J.M., VAN MAANEN, C., WIGGER, R., PETERSON, K., HOUWERS, D.J., (2008). Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leadergag regions using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* **147**: 338–344.
- BRINKHOF J., HOUWERS D., VAN MAANEN C., (2006). Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Rumin. Res.* **70**: 194– 199.

- BURGU. İ. , Y.AKÇA, F.ALKAN, A. ÖZKUL, T.KARAOĞLU, M. ÇABALAR. (1994). Antibody prevalence of Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in goats in Turkey. *Dtsch. Tierarzti. Wschr.* **101**: 390-391.
- BURGU İ., TOKER A., AKÇA Y., ALKAN F., YAZICI Z., ÖZKUL A. (1990). Türkiye’de Visna-Maedi enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* **37(3)**:538-553.
- CARPENTER S, CHESEBRO B. (1989).Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. *J Virology* **63**: 2492-2496.
- CARROZZA, M.L., MAZZEI, M., BANDECCHI, P., ARISPICI, M., TOLARI, F. (2003). In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods* **107**: 121–127.
- CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B. M., STEPHENS, E., NARAYAN, O. (1996a). Restrictive type of replication of ovine}caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology* **222**, 21-30.
- CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K. & NARAYAN, O. (1996b). Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.* **77**, 2037-2051.
- CHEBLOUNE Y., KARR B.M., SINGH D.K., NARAYAN O.(1999c). Visna Virus. *Persistent Viral Infections*. Edited by R. Ahmed and I. Chen. John Wiley& Sons Ltd. pp:347-362.
- CHEEVERS W.P., KNOWLES D.P., NORTON L. K. (1991). Neutralization-resistant antigenic variants of caprine arthritis encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. *J.Infect. Dis.* **164**: 679-685.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162(1)**: 156-9.
- COFFIN J.M., HUGHES S.H., VARMUS H.E. (1997). Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 475–585.
- COFFIN J. M. (1992). Structure and classification of Retroviruses. in Jay A. Levy. *The Retroviridae* (1st ed.). New York: Plenum Press. pp. 26-34.
- CORK LC, NARAYAN O. (1980). The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. I. Persistent viral infection with progressive pathologic changes. *Lab Invest* **42**: 596-602.
- CORK LC, HADLOW W.J., CRAWFORD T.B. (1974). Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect Dis.* **129**:134-141.
- CRAWFORD T.B., ADAMS D.S., CHEEVERS W.P. (1980).Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science.* **207**: 997-999.
- ÇİMTAY İ., KESKİN O., ŞAHİN T. (2004). Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerde bazı lentivirus enfeksiyonlarının araştırılması. *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* **23 (1-2-3)**: 33-38.
- DE ANDRES, D., KLEIN, D., WATT, N.J., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., BLACKLAWS, B.A., HARKISS, G.D. (2005). Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* **107**: 49–62.

- ELLERMAN V., BANG O. (1908). Experimentelle leukämie bei hühnern. *Zentralbl Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* **46**: 595-7.
- ELLIS T., ROBINSON W., WILCOX G.(1983). Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus. *Aust. Vet. J.* **60**: 326.
- ELTAHIR YM, DOVAS CI, PAPANASTASSOPOULOU M, KOUMBATI M, GIADINIS N, VERGHESE-NIKOLAKAKI S, KOPTOPOULOS G. (2006). Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *J Virol Methods.* **135(2)**: 240-6.
- GIL A, ROLA M, KUŹMAK J. (2006). Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol. J. Vet. Sci.* **9(4)**: 213-7.
- GJERSET B., RIMSTAD E., TEIGE J., SOETAERT K., JONASSEN C. M.(2009). Impact of natural sheep–goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet. Microbiol.* **135**: 231-238
- GRANOFF A., WEBSTER R. G. (1999). Encyclopedia of Virology. Second Edition. 223-229.
- GREGO E., LACERENZA D., REINA ARIAS R., PROFITI M., ROSATI S. (2009). Serological characterization of the new genotype E of small ruminant lentivirus in roccaverano goat flocks. *Vet Res. Commun.* **33**: 137-140.
- HAENLEIN G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research.* **51(2)**: 155-163.
- HARMACHE A., VITU C., RUSSO P., BOUYAC M., HIEBLLOT C., PEVERI P., VIGNE R., SUZAN M. (1995). The Caprine Arthritis Encephalitis Virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *J. Virol.* **69(9)**: 5445-5454.
- HECKERT R.A., POWER C.A., BRISCOE M.R. (1992). Pestivirus is a common contaminant in Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus stocks. *Can. J. Vet. Res.* **56**: 370-372.
- HERRMANN LM, CHEEVERS WP, MCGUIRE TC, ADAMS DS, HUTTON MM, GAVIN WG, KNOWLES DP. (2003).Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies for caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**: 267-271.
- ICTVdB. The Universal Virus Database of The International Committee on Taxonomy of Viruses. The Big Picture Book of Viruses: Retroviridae. <http://www.mirror-service.org/>. Erişim Tarihi: 7.06.2010.
- JAVIER R.T., BUTEL J. S. (2008). The History of Tumor Virology. *Cancer Res.* **68**: (19).
- KENNEDY-STOSKOPF S., NARAYAN O., STRANDBERG J.D.(1985). The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.* **95**: 609-617.
- KIM T., MUDRY R.A., REXRODE C.A., PATHAK V.K. (1996). Retroviral mutation rates and G-to-A hypermutations during different stages of retroviral replication. *Virology.* **70 (11)**: 7594-7602.
- KNIGHT AP, JOKINEN MP. (1982).Caprine arthritis-encephalitis. *Compend Cont Educ Pract Vet.* **4**: 263-269.

- KNOWLES JR DP. (1997). Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet Clin N Am Food Anim Pract.* **13**: 1-11.
- K PUGH DG. (2002). Sheep and Goat Medicine. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 126, 239-240, 296, 388.
- KONISHI M., TSUDUKU S., HARITANI M., MURAKAMI K., TSUBOI T., KOBAYASHI C., YOSHIKAWA K., KIMURA K.M., SENTSU H. (2004). An epidemic of caprine arthritis encephalitis in Japan: isolation of the virus. *J. Vet. Med. Sci.* **66(8)**: 911-917.
- KRAUTHAMMER C. (2005). Let's Have No More Monkey Trials - To teach faith as science is to undermine both. *Time Magazine.* 1.08.2005. (<http://www.freerepublic.com>). Erişim Tarihi: 7.06.2010.
- KUZMAK, J., ROLA, M., GALLAY, K., CHEBLOUNE, Y. (2007). Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on gag gene sequence analysis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 211-223.
- LAMARA A, FIENI F, MSELLI-LAKHAL L, TAINURIER D, CHEBLOUNE Y. (2002). Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res.* **87**: 69-77.
- LARA M.C.C.S.H., BIRGEL JUNIOR E.H., BIRGEL E.H. (2005). Possibility of vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus in neonate kids. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **57**: 553-555.
- LEITNER G., KRIFUCKS O., WEISBLIT L., LAVI Y., BERNSTEIN S., MERIN U. (2010). The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *The Veterinary Journal.* **183**: 328-331.
- LEITNER G., MERIN U., SILANIKOVE N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science.* **87**: 1719-1726.
- LEROUX C., CHASTANG J., GREENLAND T., MORNEX J.F. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.* **142**: 1125-1137.
- LINKLATER KA, SMITH MC. (1993). Color atlas of diseases and disorders of the sheep and goat. Wolfe Publishing, Aylesbury, England, 73-74, 97, 105, 139-140.
- MALHER X., SEEGER H., BEAUDEAU F. (2001). Culling and mortality in large dairy goat herds managed under intensive conditions in western France. *Livestock Production Science.* **71**: 75-86.
- MATTHEWS JG. (1999). Diseases of the Goat, 2nd ed. Blackwell Science, Chelmsford, UK, 80-87.
- MCGUIRE TC, ADAMS DS, JOHNSON GC, KLEVJER-ANDERSON P, BARBEE DD, GORHAM JR. (1986). Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am J Vet Res.* **47**: 537-540.
- MSELLI-LAKHAL L, GUIGUEN F, FORNAZERO C, FAVIER C, DURAND J, GREZEL D, MOUSSA A, MORNEX JF, CHEBLOUNE Y. (2001). Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. *Vet Res.* **32**: 429-40.

- NARAYAN O., CLEMENTS J.E., STRANDBERG J.D., CORK L.C., GRIFFIN D.E. (1980). Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.* **50**: 69-79.
- NORD K. ve ADNOY T. (1997). Effects of infection by caprine arthritis-encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.* **80**: 2391-2397.
- OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, (2008). Chapter 1.1.3: Principle of validation of diagnostic assays for infectious disease, pp.15-23.
- OLIVER R., CATHCART A., MCNIVEN R., POOLE W., ROBATI G. (1984). Transmission of caprine arthritis encephalitis virus to sheep. New Zealand. *Vet. Journal.* **32 (11)**: 199-200.
- PETERHANS E., GREENLAND T., BADIOLA J., HARKISS G., BERTONI G., AMORENA B., ELIASZEWICZ M., JUSTE R.A., KRABNIG R., LAFONT J.P., LENIHAN P., PETURSSON G., PRITCHARD G., THORLEY J., VITU C., MORNEX J.F., PEPIN M. (2004). Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res.* **35**: 257-274.
- PETERHANS E., ZANONI R., BERTONI G. (1999). How to succeed as a virus: strategies for dealing with the immun system. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* **72**: 111-117.
- PETERSON K, BRINKHOF J, HOUWERS DJ, COLENBRANDER B, GADELLA BM. (2008). Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology.* **69(4)**:433-42.
- PISONI G, BERTONI G, PURICELLI M, MACCALLI M, MORONI P. (2007). Demonstration of co-infection with and recombination of caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *J Virol.* **81(10)**: 4948-4955.
- PISONI, G., BERTONI, G., BOETTCHER, P., PONTI, W. AND MORONI, P. (2006). Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Res.* **116**: 159-167.
- RAVAZZOLO, A.P., NENCI, C., VOGT, H.R., WALDVOGEL, A., OBEXER-RUFF, G., PETERHANS, E., BERTONI, G. (2006). Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology.* **350**: 116–127.
- REINA R, BERRIATUA E, LUJÁN L, JUSTE R, SÁNCHEZ A, DE ANDRÉS D, AMORENA B. (2009). Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Vet. Journal.* **182(1)**:31-7.
- REINA R., MORA M.I., GLARIA I., GARCIA I., SOLANO C., LUJAN L., BADIOLA J.J., CONTRERAS A., BERRIATUA E., JUSTE R., MAMOUN R.Z., ROLLAND M., AMORENA B., ANDRES D. (2006). Molecular characterisation and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Research.* **121**: 189-198.
- RIMSTAD E., EAST N.E., TORTEN M., HINGGINS J., DEROCK E., PEDERSON N.C. (1993). Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 1859-1862.

- ROLLAND M., MONEY J., VALAS S., PERIN G., MAMOUN R.Z. (2002). Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain –SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.* **85**: 29-39.
- ROUS P.A. (1910). Transmissible avian neoplasm. *J. Exp. Med.* **12**: 696-705.
- ROWE JD, EAST NE. (1997). Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet Clin N Am Food Anim Pract.* **13**: 3-53.
- ROWE JD, EAST NE, FRANTI CE, THURMOND MC, PEDERSEN NC, THEILEN GH. (1992a). Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res.* **53**: 2396-2403.
- ROWE JD, EAST NE, THURMOND MC, FRANTI CE, PEDERSEN NC. (1992b). Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am J Vet Res.* **53**: 2386-2395.
- SALTARELLI M.J., SCHOBORG R., PAVLAKIS G.N., CLEMENTS J.E. (1994). Identification of caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and its cis-acting Rev-responsive element. *Virology.* **15**: 47-55.
- SALTARELLI M., QUERAT G., KONINGS D.A., VIGNE R., CLEMENTS J.E. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology.* **179**: 347-364.
- SAMAN E, VAN EYNDE G, LUJAN L, EXTRAMIANA B, HARKISS G, TOLARI F, GONZÁLEZ L, AMORENA B, WATT N, BADIOLA J. (1999). A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol.* **6(5)**: 734-40.
- SHAH C., HUDER J.B., BÖNI J., SCHÖNMANN M., MÜHLHERR J., LUTZ H., SCHÜPBACH J. (2004). Direct Evidence for Natural Transmission of Small- Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa. *J. Virol.* **78**: 7518-7522.
- SHERMAN D. M., PAUL S., GUSS B. (1992). Caprine Arthritis Encephalitis. Extension Goat Handbook. Pennsylvania State University Park.
- SURMAN P.G., DANIELS E., DIXON B.R. (1984). Caprine arthritis encephalitis virus infection of goats in South Australia. *Aust. Vet. J.* **64 (9)**: 266-271.
- SMITH MC, SHERMAN DM. (1994). Goat Medicine. Lea & Febiger, Philadelphia, , 73-79, 135-138.
- TONG -STARKSEN E.S., SEPP T., PAGTAKHAN A. S. (1996). Activation of Caprine Arthritis Encephalitis Virus long terminal repeat by gamma interferon. *J. Virol. Jan.* P.595-599.
- UNITÉDEBIOCHIMIEABTEILUNG. Fürbiochemie unit of biochemistry. Faculty of Science (www.unifr.ch/biochem). Erişim Tarihi: 7.06.2010.
- WAINBERG M.A.; FRIEDLAND G. (1998). Public Health Implications of Antiretroviral Therapy and Hiv Drug Resistance. *Journal of American Medical Association.* 1977-1983.
- WEI-SHAU H., PATHAK. V. K. (2000). Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacological Reviews.* **52 (4)**: 493-511

- YAVRU S., ŞİMŞEK A., KALE M., LEVENT O. (2001). Comparision of AGID and ELISA tests for serodiagnosis of Caprine Arthritis –Encephalitis Virus (CAEV) infection in goats in Turkey. X. International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology. Salsomaggiore- Parma, Italy, 4-7 July
- ZANONI R.G. (1998). Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **79**: 1951-1961.
- ZINK MC, YAGER JA, MYERS JD. (1990). Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am J Pathol.* **136**: 843-54.
- ZINK MC, NARAYAN O, KENNEDY PG, CLEMENTS JE. (1987).Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol* **15**: 167-80.

EK-1. Araştırmada elde edilen CAE viruslarının gag geni dizinleri (Gen Bankası kayıt numaraları)

L-114 (HM534737)

CTCCGGGGGGGAGAAGAGATTATCCTGAGATCGAAAAATGTCTCAAGAAGGCATG
TAAAATAAGAGTTCGACTCAGAGGGGAGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTGTG
GTGCCTTAAAACATTAGACTACATTGTTTGAGGAACACAAAGAGGAACCATGGA
CCAAGGTAAAATTTAGAAATATATGGCAGAAAGTAAAGAATCTGACTCCTGAGG
AGAGTAACAAAAAAGACTTTTATGTCTCTGCAGGCCACATTAGCGGGTCTAATGT
GTTGCCAAATGGGGATGCAACCAGAAACATTGCAGGATGCAATGGCAACAGTAA
CCATGAAAGATGGGTACTAGAAAGAGAGGAGAGAAGAGAAAAAAGAACAGGAAG
AAAGTGTCTTCCCAATAGTAGTGCAACAGCAGGAGGGAGAAGCTGGAAAGCAGT
AGATTCTACAATGTTCCAGCAACTGCAA

LS-105 (HM534738)

CTCCGGGGGGGAAAAGAGATTATCCTGAGATCGAAAAATGTCTCAAGAAGGCATG
TAAAATAAAAGTTCGACTCAGAGGGGAGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTGTG
GTGCCTTAAAACATTAGACTACATGTTTGAGGAACACAAAGAGAAACCATGGAC
TAAGGTAAAATTTAGAAATATATGGCAGAAAGTAAAGAATCTGACTCCTGAGGA
GAGTAACAAAAAAGACTTTTATGTCTTTGCAGGCCACATTAGCGGGTCTAATGTG
TTGCCAAATGGGGATGCAACCAGAAACATTGCAGGATGCAATGGCAACAGTAAC
CATGAAAGATGGGTACTAGAAAGAAAGGAGAGAAGAGAAAAAAGAACAGGAAGA
AAGTGTCTTCCCAATAGTAGTGCAACAGCAGGAGGGAGAAGCTGGAAAGCAGTA
GATTCTACAATGTTCCAGCAACTGCAA

LS-107 (HM534739)

CTCCGGGGGGGAAAAGAGATTATCCTGAGATCGAAAAATGTCTCAAGAAGGCATG
TAAAATAAGAGTTCGACTCAGAGGGGGGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTGTG
GTGCCTTAAAGCATTAGACTACATGTTTGAGGAACACGAAGAGGAACCATGGAC
TAAGGTAAAATTTAGAAATATATGGCAGAAAGTAAAGAATCTGACTCCTGAGGA
GAGTAACAAAAAAGACTTTTATGTCTTTACAGGCCACATTAGCGGGTCTAATGTG
TTGCCAAATGGGGATGCAACCTGAAACATTGCAGGATGCAATGGCAACAGTAAC
CATGAAAGATGGGTACTAGAAAGAGAGGAGAGAAGAGAAAAAAGAACAGGAAGA
GGGTGTCTTCCCACATAGTAGTGCAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTGGAAAGCAGT
AGATTCTACAATGTTCCAGCAACTGCAA

L-107 (HM534740)

CTCCGGGGGGGAAAAGAGATTATCCTGAGATCGAAAAATGTCTCAAGAAGGCATG
TAAAATAAGAGTTTCGACTCAGAGGGGAGCACTTGACAGAAGGAAATTGTTTGTG
GTGCCTTGAAACATTAGACTACATGTTTGAGGAACACAAAGAGGAACCATGGAC
CAAGGTAAAATTTAGAAATATATGGCAGAAAGTAAAGAATCTGACTCCTGAGGA
GAGTAACAAAAAAGACTTTTATGTCTTTGCAGGCCACATTAGCGGGTCTAATGTG
TTGCCAAATGGGGATGCGACCAGAAACATTGCAGGATGCAATGGCAACAGTAAC
CATGAAAGATGGGTACTAGAAAGAGAGGAGAGAAGAGAAAAAAGAACAGGAAGA
AAGTGTCTTCCCAATAGTAGTGCAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTGGAAAGCAGT
AGATTCTACAATGTTCCAGCAACTGCAA

BUS-27 (HM534741)

CTCCGGGGGGGAAAAGGGACTATCCTGAGCTCGAAAAATGTATCAGGCANGCATG
CAAGATAAAAGTTTCGAGTCAGAGGGGAGCACTTGACAGAAGGAAATTGCTTATG
GTGCCTTAAAACATTAGACTACATGTTTGAGGAACATAAGGAGGAGCCATGGAC
AAAAATAAAGTTTAAAAATATATGGCAAAGGTAAAGAATCTAACTCCTGAGGA
GAGTAACAAGAAAGACTTTTATGTCTTTGCAGGCCACATTAGCGGGTCTAATGTG
CTGCCAAATGGAGATAAAACCTGAGACATTGCAGGATGCAATGGCAACGGTAAC
CATGAAAGATGGGTACTAGAACAAGAGGAAAAGAAAGAAGAGAAAAAAGAAAA
GGAAGAAAGTGTCTTCCCAATAGTAGTGCAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTGGAA
AGCAGTAGATNNNACAATGTTCCAGTAAATGCAA

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Zeynep
Soyadı : BAŞARAN KARAPINAR
Doğum yeri ve tarihi : Ankara- 22.06.1979
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi ve telefonu : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji
Anabilim Dalı, VAN - 0 5325881312

II- Eğitimi

1996-2002: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
1996-1993: Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi
1989-1993: Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi/ Ortaokulu
1985-1989: Gazi İlkokulu

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

2002: Veteriner Hekim

IV- Mesleki Deneyimi

2005- 2010: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim
Dalında Araştırma Görevlisi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Mikrobiyoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları :

- Ataseven V. S., Bilge-Dagalp S., Oguzoglu T. C, **Karapinar Z.**, Güzel M., Tan M. T. (2010). Detection and Sequence Analysis of Equine Gammaherpesviruses from Horses with Respiratory Tract Disease in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases*. **57**: 271-276.

- Ataseven V. S., Bilge Dağalp S., **Başaran Z.**, Keskin S. (2010). Seroepidemiological studies of equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in working horses from the eastern Turkey. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **57**: 39-42.
- Ataseven V. S., **Başaran Z.**, Yılmaz V., Bilge Dağalp S. (2010). Van Bölgesi Keçilerinde Parainfluenza Virus-3 (PIV-3) ve Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi.* **21(1)**:7-9.
- Gencay A., Bilge Dağalp S., Can Şahna K., Pınar D., **Başaran Z.**(2009). Kayseri bölgesindeki sığırlarda Seroprevalence BHV-1 (Bovine Herpes Virus-1) enfeksiyonunun seroprevalansı. *F.Ü.Sağ. Bil. Vet. Derg.* **23 (1)**: 47-52.
- Ataseven V. S., Bilge Dağalp S., Güzel M., **Başaran Z.**, Tan M T., R.J. Geraghty.(2009). Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Research in Veterinary Science.* **86(2)**: 339-44.

Bildiri

■
Bi
lg
e
Da

ğalp S., Faraji A.R., **Karapınar Z.**, Alkan F., Özkul A. (2010). Equine Herpesvirus Infections in foals with respiratory distress in a private horse pension in Turkey. 4th European Congress of Virology.7-11 April. Italy (Poster).

- Oğuzoğlu T.Ç., Muz D., **Karapınar Z.**, Toplu N., Timurkan M.Ö., Şişman E., Burgu İ. (2010). Bir Sığır Yetiştiriciliği İşletmesindeki Buzağı Kayıplarının Viral Nedenleri Üzerine Araştırmalar. 9.Uluslararası Sempozyum. 22-27 Mart, Antakya-Hatay.
- Oğuzoğlu Ç.O., Atalay-Vural S., **Karapınar Z.**, Alkan F. (2009). Characterization and phylogenetic analysis of vaccine strain and Turkish field strain of ORF viruses. 3th Annual Meeting Epizone “Crossing borders” 12-15 May (Poster).
- Gencay A., Dağalp S.B., Can Şahna K., Pınar D., **Başaran Z.** (2008). Kayseri bölgesindeki sığırlarda Seroprevalence BHV-1 (Bovine Herpes Virus-1) enfeksiyonunun seroprevalansı. 8. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 7- 9 Ekim, Van.
- Ataseven, V.S., Bilge Dağalp S., Güzel M., **Başaran Z.**, Tan M.T., Geraghty B. (2008). “An investigation of equine herpesvirus 1 (EHV-1) and equine herpesvirus 4 (EHV-4) infections in some equide species “10. International Congress of World Equine Veterinary Association, 28 January-1 February, Moscow, Russia
- Pınar D., Oğuzoğlu T.Ç., Demir A.B., Fırat M., **Başaran Z.**, Akça Y. (2006). Bir sığır yetiştiriciliği işletmesinde BVDV ve BLV enfeksiyonları. 7. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 26- 28 Eylül, Antalya.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Erasmus Öğrenci Staj Hareketliliği Programı. National Reference Laboratory for Small Ruminant Lentiviruses. National Veterinary Research Institute (NVRI) Pulawy, Poland. 01.05- 31.07.2008.

BİYEP/ÖYEP (Bilim İnsanı Yetiştirme Projesi) dahilinde Joseph Fourier Üniversitesi, Jean Roget Enstitüsü, Adaptation et Pathogenie des Micro-organismes Departmanı Grenoble, Fransa. 15.02-16.04.2010.