

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARMARA BÖLGESİNDE KOYUNLARDA
SMALL RUMİNANT LENTİVİRUS ENFEKSİYONUNUN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Mustafa TÜRKOĞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman
Doç. Dr. Oğuzhan AVCI

KONYA-2023

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARMARA BÖLGESİNDE KOYUNLARDA
SMALL RUMİNANT LENTİVİRUS ENFEKSİYONUNUN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Mustafa TÜRKDOĞAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİMDALI

Danışman

Doç. Dr. Oğuzhan AVCI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 21212014 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2023

ÖNSÖZ

Visna Maedi Virus ile *Caprine Arthritis Encephalitis Virus* etkenleri *Small Ruminant Lentivirus* olarak gruplandırılmaktadır. *Small Ruminant Lentivirus* yüksek genetik çeşitlilik göstermekte olup; koyunlarda Maedi Visna ya da Ovine Progressive Pneumonia olarak isimlendirilen hastalığa neden olmaktadır. Horizontal ve vertikal bulaşma ile yayılan etken; persiste karakteri nedeniyle uzun süreli bir subklinik dönemin ardından hastalıkla ilişkili klinik semptomlar göstermektedir. Henüz herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmayan Maedi Visna hastalığı Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır. *Small Ruminant Lentivirus* enfeksiyonları birkaç istisnaları dışında dünya genelinde görülmektedir. Hastalığın kontrolü çerçevesinde hayvanlar ile hayvansal ürünlerin uluslararası ticaretine olan etkileri, sürüden çıkarılan hayvanlar, sürülerin negatif hayvanlar ile ikame edilmesi ve laboratuvar testleri sebebi ile ekonomik kayıplar oluşturmaktadır.

Türkiye’de bölgelerin ekolojik özellikleri ve sosyoekonomik şartlarına göre koyun yetiştiriciliği yün, et ve süt üretimi amacı ile yapılmaktadır. Koyun popülasyonunun küresel dağılımında Marmara Bölgesi’nde bulunan iller içerisinde yoğun alanlar bulunmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Small Ruminant Lentivirus* enfeksiyonunun varlığı koyunlarda bildirilmektedir. Ancak ihbarı mecburi hayvan hastalıkları içerisinde *Small Ruminant Lentivirus* enfeksiyonunun neden olduğu hastalıklar yer almamaktadır. *Small Ruminant Lentivirus* enfeksiyonu yönünden Marmara Bölgesi’nde yer alan illerin tamamının örneklediği bölgesel bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *Small Ruminant Lentivirus* etkeninin mutasyon ve antijenik değişimler nedeniyle bölgesel suşların moleküler karakterizasyonu; hastalığın teşhisi ve eradikasyonu için önemlidir. Latent persiste karakter gösteren enfeksiyonlarda antikor tespitine yönelik kullanılan serolojik analiz yöntemleri; virus varlığının gösterilmesinde değerlidir. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından *Small Ruminant Lentivirus* enfeksiyonunun tanısında seroloji ve klinik değerlendirmenin pratik ve güvenilir yaklaşım olduğu belirtilmektedir.

Bu çalışmada; enfeksiyonun teşhisinde kullanılan serolojik analiz yöntemleri karşılaştırılmış ve Marmara Bölgesi’nde bulunan sürülerde *Small Ruminant Lentivirus* etkeninin yaygınlığı ile moleküler karakterizasyonu değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Doktora eğitimim her aşamasında bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Oğuzhan AVCI'ya, eğitimime sağladıkları katkılardan dolayı Viroloji Anabilim Dalı'nın kıymetli hocaları Prof. Dr. Sibel YAVRU, Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Prof. Dr. Orhan YAPICI, Prof. Dr. Oya BULUT ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ'ye minnet ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresi boyunca yardım ve desteklerinden dolayı Dr. Öğretim Üyesi Irmak ÇAYLI DİK ve Araştırma Görevlisi Hatice Pelin ASLIM'a, Veteriner Hekim Rüveyde GÜLBAHÇE ve Biyolog Hasan Sercan PALANCI'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım konusunda imkân sağlayan Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nün değerli yöneticilerine, doktora eğitimim süresince birlikte mesai yaptığım Viroloji Laboratuvar Sorumlusu Dr. Ahmet SAİT ve Moleküler Genetik Laboratuvar Sorumlusu Dr. Eray ATIL başta olmak üzere Viroloji Laboratuvarı ile Moleküler Genetik Laboratuvarının tüm personellerine çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her aşamasında varlıklarıyla güç veren, maddi, manevi desteklerini ve bana olan inançlarını hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili annem Fatma TÜRKDOĞAN ve sayın babam Sebahattin TÜRKDOĞAN'a saygı, sevgi ve en kalbi duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

Mustafa TÜRKDOĞAN

Temmuz / 2023

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Koyunların Small Ruminant Lentivirus Enfeksiyonları	1
1.2. Etiyoloji.....	2
1.3. Taksonomi.....	6
1.4. Epidemiyoloji	8
1.5. Bulaşma.....	10
1.6. Patogenez	11
1.7. Klinik Belirtiler ve Patoloji	12
1.8. Teşhis	14
1.9. Koruma Kontrol	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Gereç	18
2.1.1. Materyal	18
2.1.2. Ticari Kitler.....	20
2.1.3. Sarf Malzemeleri.....	20
2.1.4. Cihaz, Makine ve Teçhizat.....	21
2.1.5. Test Kontrolleri	22
2.2. Yöntem	22
2.2.1 Serum Örneklerinin Hazırlanması.....	22
2.2.2. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması.....	22
2.2.3. Organ Doku Örneklerinin Hazırlanması	22
2.2.4. ELISA Testi	23
2.2.5. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi.....	25
2.2.6. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	26
2.2.7. Polimerase Chain Reaction	29
2.2.8. PCR ürünlerinin elektroforezi	31
2.2.9. Amplikonların Saflaştırılması	32

2.2.10. DNA Dizin Analizi	32
2.2.11. Sanger Dizileme Analizinin Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz	32
2.2.12. İstatistiksel Yöntem ve Analiz	35
3. BULGULAR	36
3.1. ELISA Test Sonuçları	36
3.2. AGID Test Sonuçları.....	41
3.3. Serolojik Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	43
3.4. PCR Optimizasyon Sonuçları.....	46
3.5. PCR Analiz Sonuçları	48
3.6. LTR Gen Bölgesinin Dizin Analiz Sonuçları	50
3.7. Filogenetik Analiz Sonuçları.....	51
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
6. KAYNAKÇA	68
7. EKLER.....	79
EK-A Çalışma İzni	79
EK-B Etik Kurul Kararı.....	80
EK-C Turnitin Raporu.....	81
8. ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGID	Agar Jel Immunodiffüzyon
AP	Aktivatör Proteinler
APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA'yı Düzenleyen Katalitik Polipeptit Benzeri 3
BIV	<i>Bovine Immunodeficiency Virus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base Pair
CA	Kapsid Proteini
CAEV	<i>Caprine Arthritis Encephalitis Virus</i>
DN	Doğru Negatif
DP	Doğru Pozitif
EIAV	<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
env	Envelope
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
HIV-2	<i>Human Immunodeficiency Virus 2</i>
JDV	<i>Jembrana Disease Virus</i>
kb	Kilo Baz
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matris Proteini
NC	Nükleokapsid Proteini
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometre
NPD	Negatif Prediktif Değeri
OD	Optik Dansite

OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
OPP	Ovine Progressive Pneumonia
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosfat Buffered Saline
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PLV	<i>Puma Lentivirus</i>
pol	Polimeraz
PPD	Pozitif Prediktif Değeri
PVKE	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü
rev	Regulation of Virion Protein Expression
rpm	Revolutions Per Minute
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
SRLV	<i>Small Ruminant Lentivirus</i>
SU	Surface
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tm	Melting Temperature
TM	Transmembrane
vif	Virion Infectivity Factor
VMV	<i>Visna Maedi Virus</i>
vpr	Viral Protein R
WOAH	<i>World Organization of Animal Health</i>
YN	Yanlış Negatif
YP	Yanlış Pozitif

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Bölgesinde Koyunlarda Small Ruminant Lentivirus Enfeksiyonunun Moleküler Karakterizasyonu

Mustafa TÜRKDOĞAN

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2023

Small Ruminant Lentivirus (SRLV), Maedi-Visna hastalığına neden olan, Lentivirus genusunda yer alan enfeksiyöz viral etkindir. Koyunlarda verim kaybı nedeni ile ekonomik kayıplara sebep olan ve yavaş ilerleyen persiste karaktere sahip enfeksiyon oluşturmaktadır. Ülkemizde varlığı bildirilen enfeksiyon dünya genelinde görülmektedir.

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nde enfeksiyonun yaygınlığının ve virusun moleküler karakterizasyonunun gösterilmesi ile serolojik teşhis yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu kapsamda enfeksiyonun yaygınlığı, SRLV etkenine karşı oluşan spesifik antikor varlığı 16 adet sürüden 293 adet koyun serum örneğinden ELISA test metoduyla araştırıldı. ELISA test ile 12 adet sürü (%75) içerisinde 54 adet örnek (%18.43) seropozitif tespit edildi. Virusun moleküler karakterizasyonu için 6 adet sürüden 12 adet koyun defibrine kan örnekleri ile 4 adet koyun organ örnekleri SRLV etkeninin LTR gen bölgesini hedefleyen PCR analizi ile araştırıldı. Optimize edilen PCR analizi ile 2 adet örnekte viral DNA varlığı tespit edildi. Pozitif bulunan örnekler DNA dizileme analizleri yapılarak LTR dizinleri elde edildi. LTR dizinleri filogenetik analizler ile referans suşlar ve farklı saha izolatları karşılaştırılarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu. Sekans ve filogenetik analizler ile pozitif tespit edilen 2 adet izolatın da Genotip A ile karakterize olduğu tespit edildi. Filogenetik ağaç içerisinde izolatların A24 alt tipi ile kümelendiği görüldü. Serolojik teşhis yöntemlerinin karşılaştırılması amacıyla ELISA test metodu ile AGID test metodu 100 adet koyun serum örneğinin analizleri yapılarak değerlendirildi. ELISA testi ile pozitif (n=54) ve negatif (n=46) tespit edilen örneklerin 43 adeti AGID testi ile pozitif tespit edilirken 57 adeti negatif tespit edildi. AGID ve ELISA testinin kappa değeri 0.7824 olarak hesaplandı. Güven sınırı (%95) içerisinde 0.6641 ile 0.9008 alt ve üst değerlere sahip bulundu. AGID ve ELISA testlerinin doğruluk oran değerleri %89 olarak bulundu. AGID testinin spesifite değeri ELISA testinden daha yüksek iken ELISA testinin ise sensitivite değeri AGID testinden daha yüksek olduğu hesaplandı.

Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen koyunlarda SRLV enfeksiyonunun seroprevalans oranı %18.43 olarak tespit edildi. Yerel virus izolatlarının Genotip A varlığı gösterildi. Yerel sürülerde SRLV enfeksiyonunun teşhis ve epidemiyolojik çalışmalarında fayda sağlayacak serolojik yöntemlerin karşılaştırılması yapıldı. Bu çalışmada elde edilen verilerin koyunlarda SRLV enfeksiyonlarının etiyolojik, epidemiyolojik ve eradikasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı ifade edilebilir.

Anahtar Sözcükler: Agar Jel Immunodiffüzyon; Moleküler Karakterizasyon; Seroprevalans; *Small Ruminant Lentivirus*; *Visna Maedi Virus*.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Molecular Characterization of Small Ruminant Lentivirus Infection Among Sheep in the Marmara Region

Mustafa TÜRKDOĞAN

Department of Veterinary Virology

PhD THESIS / KONYA-2023

Small Ruminant Lentivirus (SRLV) is an infectious viral agent in the genus Lentivirus that causes Maedi-Visna disease. It is a slowly progressive, persistent infection that causes economic losses due to yield loss in sheep. The infection, which has been reported in our country, is seen worldwide.

In this study, it was aimed to show the prevalence of infection and molecular characterization of the virus in the Marmara Region and to compare serological diagnostic methods. In this context, the prevalence of infection and the presence of specific antibodies against SRLV were investigated by the ELISA test method in 293 sheep serum samples from 16 flocks. By ELISA test, 54 samples (18.43%) from 12 flocks (75%) were seropositive. For molecular characterization of the virus, 12 sheep defibrinated blood samples and 4 sheep organ samples from 6 flocks were investigated by PCR (polymerase chain reaction) analysis targeting the LTR gene region of SRLV. The presence of viral DNA was detected in 2 samples by optimized PCR analysis. DNA sequencing analyses were performed on the positive samples, and LTR sequences were obtained. Phylogenetic trees were created by comparing LTR sequences with reference strains and different field isolates using phylogenetic analyses. It was determined that 2 isolates, which were found positive by sequence and phylogenetic analyses, were characterized by Genotype A. In the phylogenetic tree, the isolates were clustered under subtype A24. In order to compare serological diagnostic methods, the ELISA test method and the AGID test method were evaluated by analyzing 100 sheep serum samples. Of the samples that were positive (n=54) and negative (n=46) by ELISA test, 43 were positive by AGID test, and 57 were negative. The kappa value of the AGID and ELISA tests was calculated as 0.7824. Within the confidence limit (95%), 0.6641 and 0.9008 were found to have lower and upper values, respectively. The accuracy rates of the AGID and ELISA tests were found to be 89%. The specificity value of the AGID test was higher than the ELISA test, while the sensitivity value of the ELISA test was higher than the AGID test.

As a result of the study, it was observed that the seroprevalence rate of SRLV infection in sheep in the Marmara Region was 18.43%. Genotype A presence of local virus isolates was shown. A comparison of serological methods that will be useful in the diagnosis and epidemiological studies of SRLV infection was made. It can be stated that this study will contribute to the etiological, epidemiological, and eradication studies of SRLV infections in sheep.

Key Words: Agar Gel Immunodiffusion; Molecular Characterization; Seroprevalence; *Small Ruminant Lentivirus*; *Visna Maedi Virus*.

1.GİRİŞ

1.1. Koyunların Small Ruminant Lentivirus Enfeksiyonları

Koyunların *Small Ruminant Lentivirus* (SRLV) enfeksiyonları dünyada yaygın olarak görülen, Maedi-Visna hastalığına neden olan, *Lentivirus* genusunda *Visna Maedi Virus* (VMV) olarak yer alan enfeksiyöz viral bir etkindir (Ramírez ve ark 2013). *Lentivirus* içerisinde yer alan, keçilerin Caprine Arthritis-Ensefalit hastalığına neden olan *Caprine Arthritis Encephalitis Virus* (CAEV) ile SRLV olarak isimlendirilmektedir (Leroux ve ark 2010, Souza ve ark 2015).

Maedi-Visna hastalığı, Ovine Progressive Pneumonia (OPP) hastalığı olarak da ifade edilmekte olup; etkenin bulaşmasından hastalığın klinik belirtilerinin ortaya çıkmasına kadar geçen subklinik sürenin uzun olması sebebiyle VMV'nin neden olduğu bu hastalığa slow virus enfeksiyonları da denilmektedir (Ogden ve ark 2019). Enfekte olan koyunların çoğu klinik semptom göstermemesine rağmen; sürekli olarak enfekte kalır ve virus bulaştırabilir. Bu enfeksiyöz etken, damızlık koyunların sürüden ayrılması, canlı ağırlık artışına olumsuz etkisi, süt veriminde düşüklük ve ticaret kısıtlamalarından dolayı ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Peterhans ve ark 2004).

Small Ruminant Lentivirus teşhisi için antikor varlığını gösteren serolojik testler genellikle tercih edilen yöntemler olarak belirtilmektedir (Kalogianni ve ark 2020). Etkenin mutasyonları ve antijenik değişimleri serolojik testlerin diagnoz kapasitesini olumsuz yönde etkilediği gösterilmektedir (Lacerenza ve ark 2006). Serolojik testler, serokonversiyon oluşmadan teşhis edebilme kapasitesine sahip olmamasının yanı sıra etkenin antijenik değişimleri yanlış sonuçlara neden olabilmektedir (Lago ve ark 2012). Moleküler analizlerde enfeksiyon tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ancak yüksek genetik değişkenlik nedeniyle evrensel bir metot tanımlanmamıştır (Kalogianni ve ark 2020).

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü [*World Organization of Animal Health* (WOAH) eski adıyla *Office International des Epizooties* (OIE)], SRLV enfeksiyonlarının neden olduğu hastalıkları bildirim zorunlu hayvan hastalıkları listesine dahil etmiştir (OIE 2018). Koyun yetiştiriciliğinin önemli olduğu bölgelerde yaygın olan etkenin neden olduğu enfeksiyonlar ülkemizde de bildirilmiştir (Karaoğlu

ve ark 2003, Preziuso ve ark 2010, Albayrak ve ark 2012, Yavru ve ark 2012, Muz ve ark 2013).

1.2. Etiyoloji

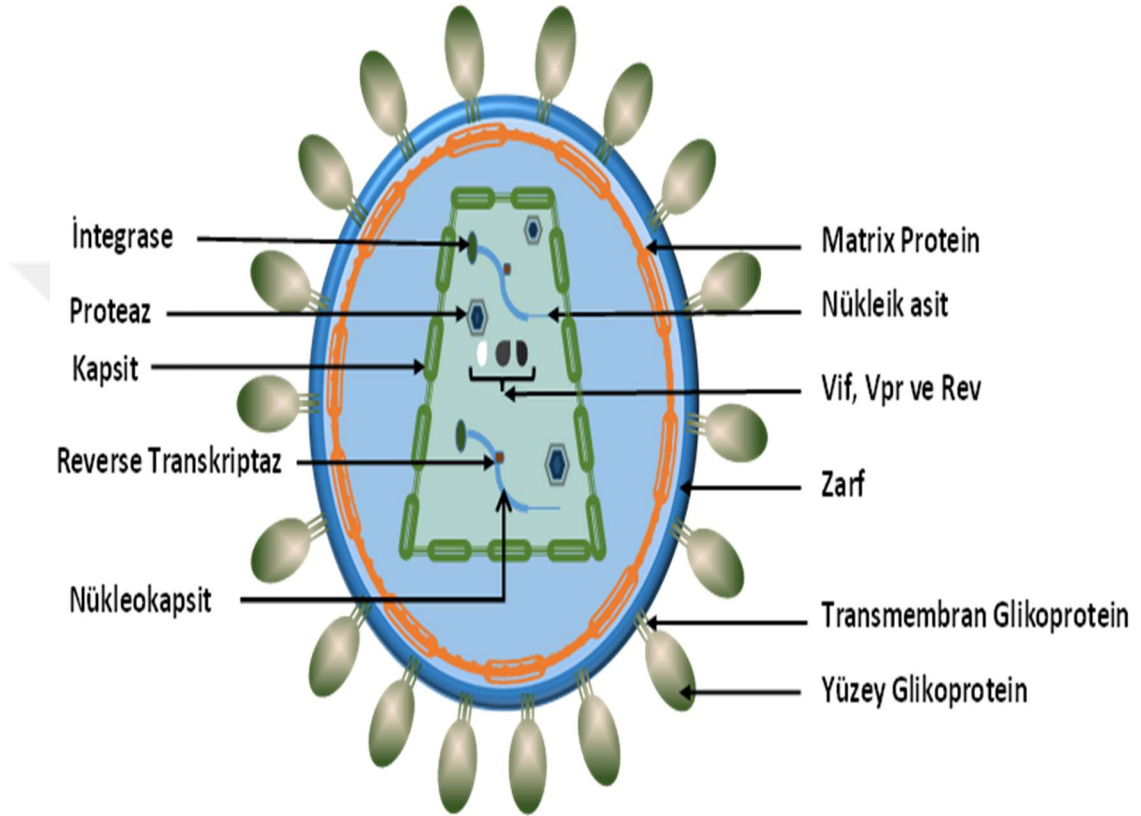
Koyunların *Lentivirus*'leri, *Retroviridae* ailesi *Orthoretrovirinae* alt ailesi *Lentivirus* genusunda bulunmaktadır (Coffin ve ark 2021). Bu genus içerisinde *Bovine Immunodeficiency Virus* (BIV), CAEV, *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV), *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV), *Human Immunodeficiency Virus 1* (HIV-1), *Human Immunodeficiency Virus 2* (HIV-2), *Jembrana Disease Virus* (JDV), *Puma Lentivirus* (PLV), *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) ve VMV yer almaktadır (ICTV 2021). Genusun alt basamağında ayrı olarak yer alan VMV ve CAEV, genomik yakınlıkları, fenotipik benzerlikleri ve türler arası geçişleri nedeniyle SRLV olarak da ifade edilmektedir (Gifford 2012).

Tablo 1.1. Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi tarafından yapılan *Lentivirus* taksonomisi (ICTV 2021).

<i>Retroviridae</i>	<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Lentivirus</i>	<i>Bovine Immunodeficiency Virus</i>
		<i>Betaretrovirus</i>		<i>Caprine Arthritis Encephalitis Virus</i>
		<i>Deltaretrovirus</i>		<i>Equine Infectious Anemia Virus</i>
		<i>Epsilonretrovirus</i>		<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
				<i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
				<i>Human Immunodeficiency Virus 2</i>
		<i>Gammapretrovirus</i>		<i>Jembrana Disease Virus</i>
		<u><i>Lentivirus</i></u>		<i>Puma Lentivirus</i>
				<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
				<u><i>Visna-Maedi Virus</i></u>

Small Ruminant Lentivirus, virion büyüklüğü 80-100 nanometre (nm) çapa sahip olup, içten dışa nükleokapsid, kapsid, matris ve zarftan oluşmaktadır. Nükleokapsid helikal simetrik olup kübik simetrik kapsid ile çevrelenmiştir. Viral genom 8,4-9,2 kilo baz (kb) arası uzunluğunda birbiri ile diploid olan iki adet tek iplikçikli pozitif polariteli RNA (ssRNA) yapısındadır (Gomez-Lucia ve ark 2018).

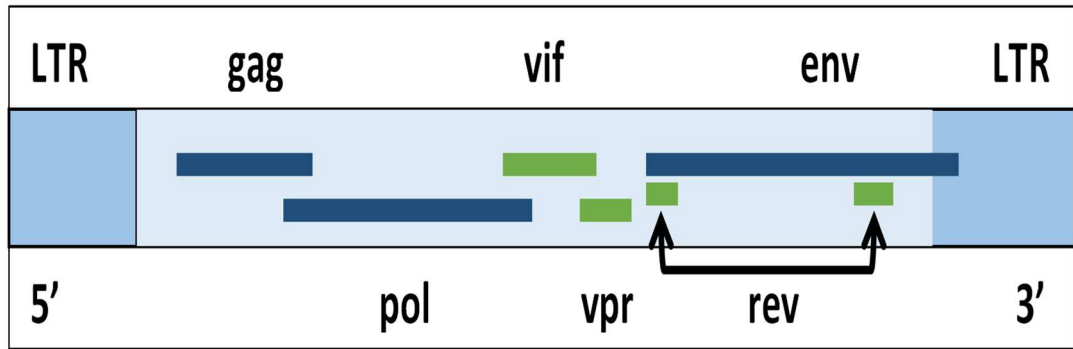
Virion içerisinde ayrıca reverz transkriptaz (RNA bağımlı DNA polimeraz), proteaz ve integras enzimleri bulunmaktadır. Virionun en dışında lipid çift bir tabaka ve glikoproteinler tarafından oluşturulan zarf bulunur. Bu glikoproteinler transmembran glikoproteinleri [transmembrane (TM)] ve yüzey glikoproteinlerini [surface (SU)] ifade etmektedir (Minguijón ve ark 2015). Şekil 1.1’de virion yapısının şematik diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 1.1. SRLV virion yapısının şematik diyagramı Office, Microsoft 365 ile oluşturulmuştur.

Lentivirus’lar kimyasal yapısı yaklaşık olarak %60 protein, %35 lipid, %3 karbonhidrattan oluşmaktadır (Minguijón ve ark 2015). Kimyasallara karşı çok dayanıklı değildir ve kloroform, eter, etanol, formaldehit, fenol, ribonükleaz ve tripsin tarafından inaktive edilebilmektedir. Sıcaklık olarak 56°C’de 10 dakika inaktive olur, ancak 4°C’de 4-5 aya kadar aktif kalabilmektedir. Uzun süre -80°C’de aktivitesini korur ve birkaç dondurma/çözdürme işlemine dayanabilmektedir. Alkali ortamları asidik ortamlardan daha iyi tolere eder, enfektivitesini pH 5 ile 10 arasında korumaktadır ancak pH<4.2’de inaktive olmaktadır (Spickler 2015).

Small Ruminant Lentivirus genomunun her iki ucunda Long Terminal Repeat (LTR) gen bölümü bulunmaktadır (Gifford 2012). LTR dizilimleri arasında üç yapısal gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar, grup-spesifik antijen (gag), polimeraz (pol) ve zarf [envelope (env)] gen bölgeleridir (Gomez-Lucia ve ark 2018). Bunun dışında viral genom üç adet yardımcı gen bölgesi daha içermektedir. Bunlar ise vif (virion infectivity factor), vpr (viral protein R) ve rev (regulation of virion protein expression) gen bölgeleridir (Gifford 2012). Şekil 1.2’de SRLV genom organizasyonu gösterilmektedir.



Şekil 1.2. SRLV genom organizasyonu Office, Microsoft 365 ile yapılmıştır.

Small Ruminant Lentivirus genomunun 5' ve 3' uçları da tekrar dizinler olan LTR gen bölgesi U3, R ve U5 olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (Barros ve ark 2005). U3 bölgesi promotor/enhancer dizisini ve transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini içermektedir. Bu bölgeler aktivatör proteinler (AP)-1, AP-4 ve AML (vis) gibi transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleridir. Ayrıca bu bölgeler viral transkripsiyonunun regülasyonunu sağlar ve gen ekspresyonunu modüle etmektedirler (Cambbell ve Avery 1996, Sutton ve ark 1997). SRLV'lerin LTR gen bölgesinde meydana gelen delesyon veya duplikasyon gibi çeşitli mutasyonların; virulansı, hücresel tropizmi ve patogenezi etkilediği gösterilmiştir (Agnarsdóttir ve ark 2000, Oskarsson ve ark 2007, Glaria ve ark 2012).

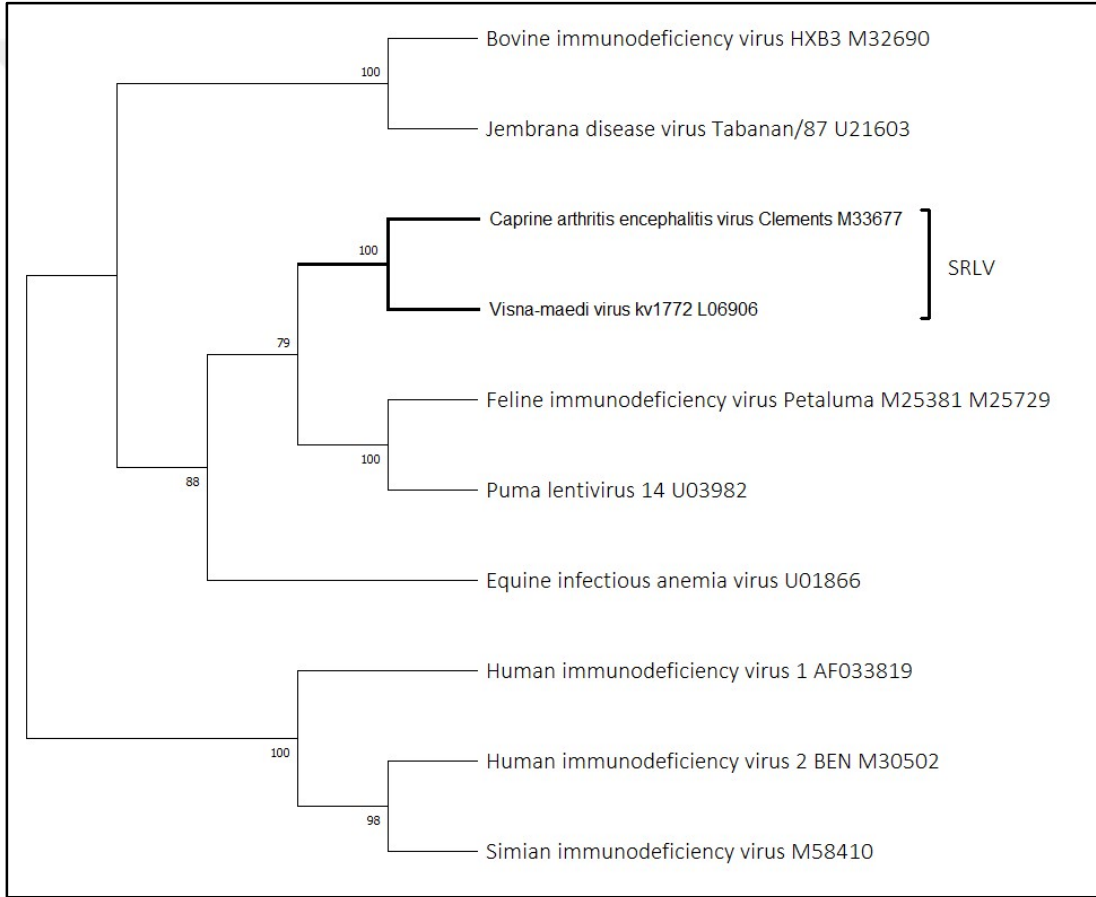
Gag gen bölgesi, polyprotein PR55gag sentezini kodlamaktadır. Bu polyprotein, kapsid proteini (CA), nükleokapsid proteini (NC) ve matris proteini (MA) oluşumu için öncülük sağlamaktadır (Picotto ve ark 2021). Bu virion internal proteinlerinin oluşumu viral proteazların aktivitesi ile gerçekleşmektedir (Leroux ve ark 2010). Virionun eksternal yapısal proteinlerini kodlayan ise env gen bölgesidir.

Bu gen bölgesi viral zarfı oluşturan konakçı hücrelerinden köken alan lipid çift bir tabaka boyunca dağılmış glikoproteinlerin kodlanmasını sağlamaktadır. Bunlar TM ve SU glikoproteinleridir. Konakçı reseptörleri ile virus arasındaki bağlantıda epitop olarak görev almaktadırlar. Ayrıca nötralizan antikorları indükleyen antijenik determinantlardır (Zahno ve Bertoni 2018). Diğer gen bölgesi pol, viral replikasyon için gerekli olan enzimlerin kodlanmasını sağlamaktadır. Bunlar RNase H, integrase (IN), reverse transcriptase (RT), protease (PR) ve deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolyase (dUTPase) enzimleridir (Minguijón ve ark 2015).

Vif geni, triptofan bakımından zengin, bazik karakterde ve konakçı hedef hücrelerde SRLV'lerin enfektivitesi için önemli olan vif proteinini kodlamaktadır (Franzdóttir ve ark 2016). Konakçıya özgü olan Apolipoprotein B mRNA'yı düzenleyen katalitik polipeptit benzeri 3 (APOBEC3) proteinleri antiviral etkiye sahip olup, vif proteinleri ile olan ilişkisi önemlidir (Ramírez ve ark 2013, Harris ve Dudley 2015). Koyunlarda bilinen APOBEC3Z1, APOBEC3Z2 ve APOBEC3Z3 olmak üzere üç adet APOBEC3 proteinlerine sahiptir. Bu proteinler VMV'e karşı antiviral etki gösterebilmektedir. Bu antiviral etki virusun reverz transkripsiyonu sırasında sitozin deaminasyonu ile oluşmaktadır. Hipermutasyon olarak tanımlanan bu durum viral genomun konakçı genomuna entegrasyonunu ve viral replikasyonunu olumsuz yönde etkilemektedir. Viral vif proteinlerinin APOBEC3 proteinlerini interfere edebilmesi enfeksiyon için önemlidir (Zhang ve ark 2014, Esparza-Baquer ve ark 2015). Bir diğer yardımcı gen olan vpr, viral protein R'nin kodlanmasında görev almaktadır. Bu gen bölgesinin daha önceden HIV-1 tat proteinine benzer bir protein kodladığı ifade edilmekteydi. Ancak tat proteini transkripsiyon transaktivatörü olarak görev almakta iken vpr ise konakçı hücresinin mitozunu olumsuz etkilediği belirtilmektedir. Bu özellikleriyle SRLV vpr gen bölgesinin HIV-1 vpr gen bölgesi ile yapısal ve fonksiyonel olarak benzer protein kodladığının tespit edildiği bildirilmiştir (Villet ve ark 2003). SRLV'nin vpr gen bölgesi için belirtilen bu özellikler geçerliliğini devam ettirmekte birlikte daha fazla çalışma ile açıklanmaya ihtiyaç duymaktadır (Romani ve Cohen 2012). SRLV'lerde bulunan son yardımcı gen rev, 19 kDa'lık (167 amino asit) bir proteini kodlamaktadır (Mazarin ve ark 1990). Rev geni dört ekzondan oluşmaktadır (Pépin ve ark 1998). Viral transkriptlerin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasına yardımcı olmaktadır. Böylelikle viral proteinlerin ekspresyonuna katkı sağlamaktadır (Andrésdóttir 2018).

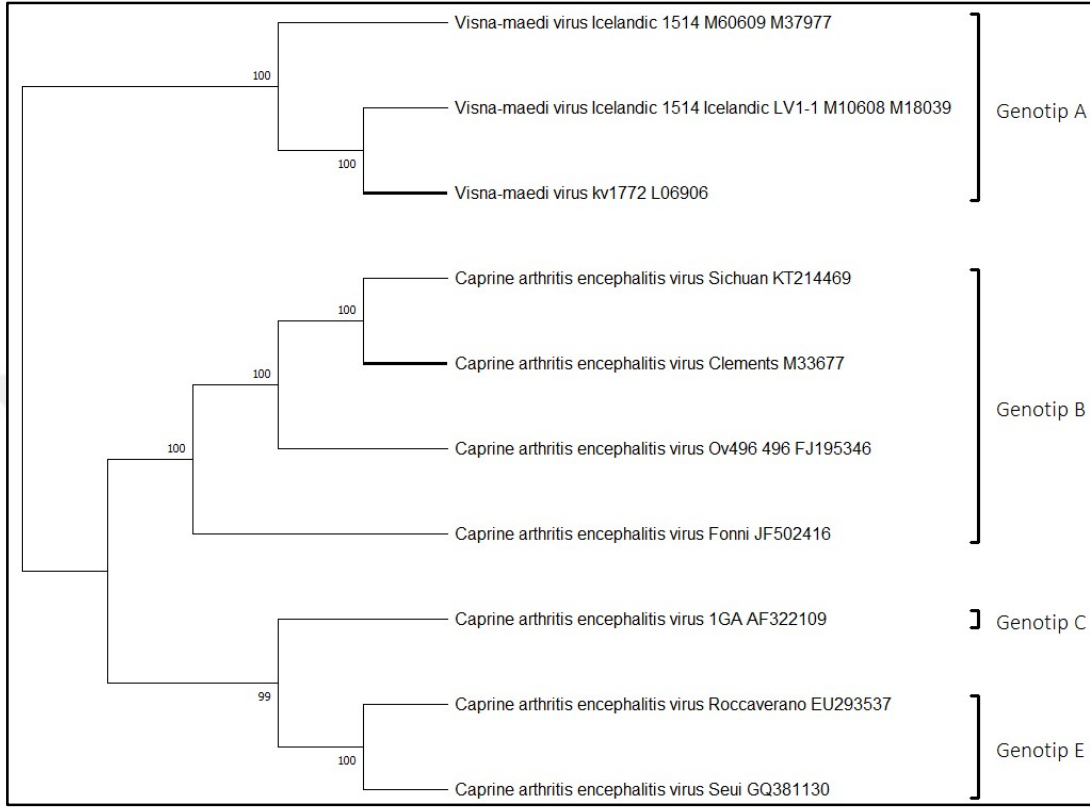
1.3. Taksonomi

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesinin [*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)] güncel sınıflandırmasında VMV; *Retroviridae* ailesi içerisinde *Orthoretrovirinae* alt ailesinin *Lentivirus* genusunda yer almaktadır. Aynı genus içerisinde VMV ile birlikte BIV, CAEV, EIAV, FIV, HIV-1, HIV-2, SIV, JDV ve PLV bulunmaktadır (Coffin 2021, ICTV 2021). ICTV (2021) tarafından bildirilen referans suşların filogenetik ağacı Şekil 1.3’de gösterilmektedir. VMV *Lentivirus* içerisinde CAEV ile filogenetik korelasyon göstermektedir. Koyunlar ve keçiler arasında VMV ve CAEV suşlarının bulaşının gösterilmesi nedeni ile SRLV olarak ifade edilmektedir (Souza ve ark 2015).



Şekil 1.3. *Lentivirus* genusunda yer alan virusların dizinlerinden oluşturulan filogenetik ağaç görünümü. ICTV tarafından *Lentivirus* alt tiplerinin sınıflandırılmasında kullanılan suşlardan oluşturulan filogenetik ağaç görünümü. SRLV ayrımı 3 piksel kalınlık ile gösterildi. Referans dizinler NCBI GenBank veri tabanından elde edildi. Mega 11 programı yardımıyla MUSCLE yönteminde UPGMA metodu seçilerek hizalanan dizinler maximum-likelihood metodu kullanılarak ağaç oluşturuldu.

Small Ruminant Lentivirus içerisinde farklı suşların yüksek derecedeki genetik değişkenliği nedeni ile filogenetik analizler ile karakterize edilmektedir (Shah ve ark 2004). SRLV izolatları, A, B, C, D ve E olmak üzere beş filogenetik grup olarak sınıflandırılmaktadır (Grego ve ark 2007).



Şekil 1.4. SRLV genotip dizinlerinden oluşturulan filogenetik ağaç görünümü. Referans dizinler NCBI GenBank veri tabanı kullanılarak alındı. Mega 11 programı yardımıyla MUSCLE yönteminde UPGMA metodu seçilerek hizalanan dizinlerde maximum-likelihood metoduyla kullanılarak ağaç oluşturuldu.

Genotip A, VMV benzeri suşları temsil etmekte ve 27 alt tip (A1-A27) yer almaktadır (Olech ve ark 2022). Genotip B ise CAEV benzeri suşları ifade etmekte ve beş alt tip (B1-B5) yer almaktadır (Michiels ve ark 2020). Genotip E grubu ise E1 ve E2 olmak üzere 2 alt tip yer almaktadır (Giammarioli ve ark 2011). Genotip A ve B içerisinde yer alan viruslar dünya çapında en baskın suşlar olarak belirtilmektedir. Genotip A yüksek genetik heterojenite, Genotip B ise düşük genetik heterojenite göstermektedir (Molae ve ark 2020). Genotip B içerisinde B4 alt türünün rekombinant suş olduğu ve B5 alt türünün ise B1 alt türü olduğu ifade edilmektedir. Bundan dolayı genotip B içerisinde 3 alt türün olduğu son çalışmalarda belirtilen bir diğer unsurdur (L'Homme ve ark 2015, Arcangeli ve ark 2022). Genotip C ve E içerisinde yer alan viruslar ise sırasıyla Norveç ve İtalyan suşları ile sınırlı olduğu ifade

edilmektedir. Genotip D grubu içerisinde İsviçre ve İspanya'dan tespit edilen birkaç izolat yer almaktadır ancak genotip A içerisinde sınıflandırılması ön görülmektedir (Ramírez ve ark 2013, Arcangeli ve ark 2022).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda tespit edilen örneklerin genotip A ve B olarak sınıflandırıldığı bildirilmiştir (Bertolotti ve ark 2011, Muz ve ark 2013).

Small Ruminant Lentivirus'un LTR geni kullanılarak yapılan filogenetik analizler ile bölgesel sirküle olan izolatların filogenisi yapılabilmektedir (Mendiola ve ark 2019). LTR gen sekansı SRLV'nin moleküler karakterizasyonunda alt tipe özgü dizinleri gösterdiği belirtilmektedir (Olech ve ark 2022).

1.4. Epidemiyoloji

Maedi-Visna hastalığının ilk vakaları 1930'lu yıllarda İzlanda'da meydana gelen epidemide görülmüştür. Almanya'dan 'Kararul' koyunlarının ithal edilmesinden sonra bu epideminin başladığı belirtilmiştir (Sigurdsson ve ark 1952, Sigurdsson 1954). 'Maedi' yavaş ilerleyen bir pnömoni, 'Visna' ise merkezi sinir sistemi hastalığı olarak ifade edilmiştir (Sigurdsson ve ark 1957). Bulaşıcı ve büyük olasılıkla bir virusun neden olduğu ifade edilirken hasta koyunlardan virusun izole edilmesi 1950'li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Sigurdsson ve ark 1960). Ayrıca Güney Afrika, Amerika Birleşik Devletleri ve Fransa gibi diğer ülkelerde farklı isimler ve farklı zamanlarda hastalığın adlandırıldığı belirtilmektedir (Straub 2004). Etkenin bulaşmasından klinik belirtilerin ortaya çıkmasına kadar süren asemptomatik dönemin uzun olması, klinik belirtilerin ise kademeli olarak yavaş ilerleyen karakter göstermesi ve hastalığın ölümle sonuçlanması nedeniyle VMV'leri 'slow viruslar' kavramını ortaya çıkarmıştır (Harris 1976). Enfekte olan hayvanların uzun süre klinik belirti göstermemesi ve uluslararası hayvan ticareti nedeni ile hastalığın Avustralya (CAEV enfeksiyonlarından bağımsız olarak) ve Yeni Zelanda istisnaları dışında birçok ülkede tespit edildiği bildirilmiştir (Teles ve ark 2023). Başlangıçta VMV ve CAEV birbirinden ayrı iki viral tür olarak kabul edilmiştir. Ancak konakçı (koyun ve keçiler) bariyerini aşması, genetik, antijenik ve serolojik benzerlikler nedeniyle bu viruslar için '*Small Ruminant Lentivirus*' tanımı sıklıkla kullanılmaktadır (Minardi da Cruz ve ark 2013).

1981-2020 yılları arasında koyunlarda SRLV prevalansına yönelik yayınlanan meta-analizde, Avrupa %40.9 prevalans göstererek kıtalar arasında en yüksek değere

sahip ve en fazla çalışmanın yapıldığı kıta olmuştur. Afrika, Asya ve Kuzey Amerika kıtalarının, %16.7 ile %21.8 arasında prevalans değerleri gösterdiği bildirilmiştir. Güney ve Orta Amerika ise en düşük SRLV prevalansına sahip olduğu kıtalar içerisinde de farklı bölgeler prevalans değerlerinde heterojen dağılım gösterdiği ifade edilmiştir (de Miguel ve ark 2021).

Ülkemizde VMV enfeksiyonunun varlığı farklı illerin mezbahalarından alınan koyun örneklerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi ile ilk kez 1975 yılında gerçekleştirilmiştir (Alibaşoğlu ve Arda 1975). Batı Almanya'dan 1985 yılında ithal edilen 9 adet Ostfiriz ırkı koçun klinik olarak solunum problemleri göstererek öldükleri belirtilmiştir. Ölen 2 adet koçtan hazırlanan örnekler makroskopik, histopatolojik ve serolojik testler ile incelenerek Agar Jel Immunodiffüzyon (AGID) yöntemiyle serumları VMV enfeksiyonu yönünden antikor pozitif tespit edildiği bildirilmiştir (Girgin ve ark 1987).

Ülkemizde SRLV prevalansı ile ilgili koyunlarda yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Farklı illerde bulunan 23 adet sürüden hazırlanan 911 adet koyunun serum örnekleri ile bu koyunlar içerisinde 757 adet defibrine kan örnekleri analiz edilmiştir. Yapılan analiz ile 465 adet koyunda antikor varlığı tespit edilirken 414 adet koyunda ise nükleik asit varlığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada SRLV prevalansı %67.8 (618/911) oranında bildirilmiştir (Muz ve ark 2013). Antikor varlığının kontrolü amacıyla 8 farklı ilden 9 adet küçük aile işletmesinden 825 adet koyun serum örneklerinden yapılan çalışmada 6 adet işletmede spesifik antikor belirlenmiş ve tüm örnekler içerisinde %2.6 oranında tespit edildiği rapor edilmiştir (Karaoğlu ve ark 2003). Genetik ilişkilendirme amacı ile yapılan bir çalışmada 6 farklı ilden 11 adet sürüden 2266 tane koyun kan serum örnekleri serolojik incelenmiş ve 8 adet sürünün enfekte olduğu rapor edilmiştir. Pozitiflik belirlenen sürüler arasında en düşük %2, en yüksek ise %83 seroprevalans değerleri rapor edilmiştir (Yaman ve ark 2019). Karadeniz bölgesinde 583 adet koyun serum örneklerinden ELISA testi ile yapılan bir çalışmada seroprevalans %23.5 olarak belirlediklerini bildirmişlerdir (Albayrak ve ark 2012). Yavru ve ark (2012) Konya'nın farklı ilçelerinde bulunan işletmelerden aldıkları 1343 adet koyun kan serum örneğinden 39 tanesinin (%2.90) VMV karşı antikor taşıdığı tespit ettiklerini bildirdikleri çalışmada seropozitiflik oranlarının işletmelere göre %0.85 ve %13.33 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. (Yavru ve ark 2012). Prezioso ve ark (2010) İstanbul'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada 542 adet

koyun serum örneklerinden VMV enfeksiyonun seroprevalansını %15.3 olarak belirlediklerini ayrıca yaşlı koyunların genç yaştaki koyunlara göre yaklaşık 5 kat daha fazla seropozitifliğe sahip olduğunu rapor etmişlerdir. (Preziuso ve ark 2010).

1.5. Bulaşma

Small Ruminant Lentivirus'un horizontal ve vertikal bulaşma yolları ile yayıldığı bilinmektedir (OIE 2018). Ancak bulaşma yollarının hastalığın epidemiyolojisindeki rolleri ile ilgili aydınlatılamayan hususlar bulunmaktadır (Wolf 2021). Enfeksiyonun persiste karakteri, enfekte asemptomatik koyunlar, enfekte olanlarla enfekte olmayan koyunların temas süresi ve yetiştirme koşulları SRLV'nin yeni bir sürüye geçişini ve sürü içindeki bulaşmasını etkileyen önemli faktörlerdir (Junkuszew ve ark 2016, Illius ve ark 2020, Wolf 2021).

Horizontal bulaşmanın kaynakları solunum salgıları, kolostrum, süt ve dışkı olarak belirtilmektedir (Illius ve ark 2020). Solunum yolu horizontal bulaşmanın önemli bir yolu olarak gösterilmektedir (Berriatua ve ark 2003, Torsteinsdóttir ve ark 2003). Virusun alt solunum yollarına geçmesiyle enfeksiyona neden olduğu bildirilmektedir (McNeilly ve ark 2007). Solunum yolu ile bulaşmada koyunların yakın teması önemlidir. Kapalı ağıllarda uzun süre bakım, sayıca kalabalık ağıllar ve havalandırma yetersizliği sürü içerisinde enfeksiyonun yayılmasına uygun koşulları sağlamaktadır (Leginagoikoa ve ark 2010,). Laktojenik bulaşma kolostrum ve süt ile gerçekleşmektedir (Broughton-Neiswanger ve ark 2010). Etken meme bezi epitelleri ile memede bulunan makrofajlara tropizm göstermektedir (Bolea ve ark 2006, Gayo ve ark 2018). Bundan dolayı kolostrum ve sütte virus bulunabilmektedir (Gayo ve ark 2019). Kuzuların doğumunu takiben yaşamlarının ilk günlerinde sindirim sisteminin geçirgenliği daha yüksek olması virus geçişine izin verebilmektedir (Preziuso ve ark 2004). Bu sebeple enfekte sürülerde laktojenik yolla bulaşmanın önemli olduğu düşünülmektedir (Preziuso ve ark 2004, Blacklaws ve ark 2004). Aerosol bulaşma, çevresel kontaminasyon, enfekte alet ve ekipmanların kullanımı ve iatrojenik bulaşma mekanizmaları ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kalogianni ve ark 2020). Enfekte koyunların bulunduğu ağıllarda havada ve suda etkenin tespit edilmesi (Villoria ve ark 2013), ayrıca etkenin solunum salgılarında, süt ve dışkıda bulunması bulaşmada çeşitli riskleri barındırmaktadır (Wolf 2021).

Transplasental ya da doğum sırasında genital kanaldan yavruya virusun geçişi ile vertikal bulaşmanın olabileceği belirtilmektedir (Cutlip ve ark 1988, Brodie ve ark

1994). Etkenin koçların semeninde ve genital kanalında tespit edilmesinden dolayı cinsel yolla bulaşma riski de bulunmaktadır (Blacklaws ve ark 2004, Peterson ve ark 2008).

1.6. Patogenez

Koyunların SRLV ile enfeksiyonunun konakçı dokularının mukozal yüzeyinden geçmesiyle başladığı belirtilmektedir. Virusun sıklıkla solunum sistemi ya da bağırsak mukozal yüzeylerini kullandığı bildirilmektedir (Ryan ve ark 2000, McNeilly ve ark 2008). Karbonhidrat reseptörleri ile virion etkileşimi *Lentivirus*'lerin hücrelere girmesini sağlamaktadır. Mannoze reseptörünün de benzer şekilde koyunlarda SRLV enfeksiyonlarında rol oynayabileceği belirtilmektedir (Crespo ve ark 2011). Etken monositlere, makrofajlara ve dendritik hücrelerine tropizm göstermektedir (McNeilly ve ark 2008). Bundan dolayı virus geçişini gerçekleştirdiği bölgedeki dendritik hücreleri enfekte edebilmektedir. Enfekte olan dendritik hücreler antijen sunan hücreler olmasından dolayı lenf yumrularına göç ettiklerinde virus partiküllerini makrofajlara sunmaktadır. Bu sayede virus replikasyonunun gerçekleştirebildiği makrofajlara iletilmektedir (McNeilly ve ark 2008). Makrofajlara etkenin iletilmesinden sonra konakçı organlarına yayılım gösterebilmektedir. Stromal hücrelerin ya da miyeloid hücrelerin enfekte olması durumunda enfeksiyon latent seyredebilmektedir (Davies ve ark 2023). Bu hücrelere viral reverse transcriptase enzimi ile genom integrasyonu gerçekleşebilmektedir (Andrésdóttir 2018). Bunun sonucunda enfeksiyona özgü persiste mekanizma oluşmaktadır. Bu nedenle yeni üretilen hücrelerin enfekte olması konakçının yaşam boyu virus maruziyetine sebebiyet vermektedir. Üretildikten sonra dolaşıma geçen enfekte monositler; akciğer, meme bezi, beyin ve eklem gibi dokulara etkenin sirkülasyonuna neden olmaktadır (Clements ve Payne 1994, Clements ve Zink 1996). Enfekte monositlerde viral replikasyon sınırlıdır. Ancak monositler dokularda makrofajlara olgunlaşmaktadır. Doku makrofajlarında etkenin replikasyonu ile oluşan viral antijenlere karşı konakçının immun yanıtı sistematik olarak başlamaktadır. Bunun sonucunda dokuda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu oluşmaktadır. Mononükleer hücre artışı virusun replikasyonunun gerçekleştiği makrofaj hücrelerinin sayısını ve latent enfekte monositlerin dokuya iletimini arttırmaktadır. İmmun yanıt hücreleri etkenin inaktivasyonunu gerçekleştiremeyip belirtilen mekanizmada beklenenin aksine virusun yayılımına neden olmaktadır. Bu durum 'Truva atı mekanizması' olarak

bilinmektedir (Geballe ve ark 1985, Haase 1986). Konakçı immun yanıtı ve etkenin latent enfeksiyon özelliği dokularda sürekli devam eden inflamatuvar oluşturmaktadır. Bu inflamatuvar SRLV ile enfekte koyunlarda görülen patolojik değişikliklerin sebebi olarak gösterilmektedir (Blacklaws 2012).

SRLV enfeksiyonu koyunlarda multisistemik inflamatuvar ile Maedi-Visna hastalığına neden olmaktadır. İnfiltrasyon nedeni ile dokularda lenfosit birikimi gerçekleşmektedir. Ayrıca mononükleer hücreler dokuda tahribat oluşturmaktadır. Bunların üzerine dokunun yapısal bozuklukları ve gelişen işlev eksiklikleri dokulara özgü patolojik değişiklikleri meydana getirmektedir (Blacklaws ve Harkiss 2010).

1.7. Klinik Belirtiler ve Patoloji

Maedi-Visna hastalığı solunum ve sinir sisteminde neden olduğu belirtiler ile karakterizedir. Bunun yanı sıra mastitis ve arthritits gibi klinik belirtiler de gösterebilmektedir (Azevedo ve ark 2018). SRLV enfeksiyonunda virus suşu ve koyun ırkı klinik belirtilerde çeşitliliğe neden olmaktadır. Hastalık süreci genellikle subklinik seyrete de klinik belirtiler gösterebilmektedir. Belirtiler genellikle asemptomatiktir ancak klinik olarak ilerleyici bir karaktere sahiptir (Minguijón ve ark 2015, Gomez-Lucia ve ark 2018). Koyunlarda solunum formu ‘Maedi’, daha nadir karşılaşılan sinirsel formu ise ‘Visna’ olarak isimlendirilmektedir (Narayan ve Cork 1985).

Maedi-Visna hastalığının inkübasyon süresi birkaç aydan yıllar süren oldukça değişiklik gösteren bir süreçtir. Maedi formuna özgü klinik belirtiler genellikle 3-4 yaşlarında iken gelişmektedir. Ancak Visna formu 2 yaşlı koyunlarda görülebilmekte olup, kuzuları da etkilediği belirtilmiştir (Spickler 2015).

Small Ruminant Lentivirus’un slow virus olması sebebiyle konakçı hücrelerinde replikasyonu genellikle yavaştır. Bu özelliği kanda dolaşan virus miktarının da az olmasına sebep olmaktadır (McNeilly ve ark 2008). Hastalığın bu safhası latent dönem olarak isimlendirilmekte ve subklinik bir seyir göstermektedir (Blacklaws 2012). Klinik belirtiler erken evrede ya yoktur ya da asemptomatik belirtiler olmaktadır. Yaşlanma, hastalıklar ve çeşitli stres faktörleri nedeni ile koyunlarda gelişen immunsupresyon, virus replikasyonunun hızlanmasına sebep olmaktadır. Hastalık bu seyrinde kademeli olarak artan klinik belirtiler gösterebilmektedir (Gomez-Lucia ve ark 2018). SRLV enfeksiyonunun seyri, virus suşuna, konakçı immun yanıtına ve konak genetik profiline bağlı değişebilmektedir

(Reina ve ark 2013, Gayo ve ark 2018). SRLV enfeksiyonları nedeni ile dokularda ve organlarda oluşan lezyonlar, viral antijenlere karşı gelişen immün yanıt ve viral replikasyon sonucu oluşmaktadır (Blacklaws 2012). Koyunlarda SRLV enfeksiyonu akciğerlerde, meme bezinde, sinir sisteminde ve eklemlerde bulunan dokuları etkilemektedir (Minguijón ve ark 2015). Pnömoni ve mastitis bu nedenle sık karşılaşılan klinik belirtiler arasında yer almaktadır. Organlarda oluşan lezyonların şiddeti farklılık gösterse de hastalığın devam eden sürecinde birçok organın enfeksiyonu söz konusu olabilmektedir (Angelopoulou ve ark 2006, Brellou ve ark 2007).

Koyunlarda en sık görülen klinik form solunum formudur. Yetişkin hayvanları etkilemektedir ve klinik belirtilerin ortaya çıkmasından sonra yaşam süresi bir yılı geçmediği belirtilmektedir (López ve Martinson 2017). Solunumla ilgili klinik belirtiler, karakteristik lenfositik interstisyel pnömoni sonucunda gelişmektedir (Borquez ve ark 2021). İlk olarak egzersiz intoleransı fark edilen klinik belirtilerden biridir, devam eden süreçte dispnea ve hızlı nefes alıp verme görülmektedir. Boyun ekstansiyonu, istirahat halinde nefes darlığı ve burun deliklerinde genişleme karşılaşılan diğer bulgular arasındadır. Hastalık ilerledikçe anoreksi ve kaşeksi belirgin hale gelmektedir (Barquero ve ark 2015). Nekropside akciğerlerin renksiz oluşu ve büyümüş olduğu görülmektedir. Plevral yüzeyde lenfoid hiperplazinin neden olduğu fokal ya da diffüz dağılım gösteren gri-beyaz lekeler görülebilmektedir. Mediastinal lenf düğümlerinde sıklıkla büyüme gözlenmektedir (Spickler 2015). Mikroskopisinde alveolar septum da mononükleer hücrelerin infiltrasyonu ve alveolar düz kasların hipertrofisi görülmektedir (Cecco ve ark 2023). Bronş ve bronşiol epitelde hiperplazi meydana gelebilmektedir. Ağır vakalarda fibrozis oluşabilmektedir (Minguijón ve ark 2015).

Sinirsel formu koyunlarda daha nadirdir ve genellikle 2 yaşından büyük hayvanları etkilemektedir. Ancak bazı ırklarda daha genç hayvanlarda da görülebilir (Benavides ve ark 2007, Akkoç ve ark 2011). Sinirsel olarak klinik belirtileri arasında arka ayaklarda güçsüzlük, ataksi, inkoordinasyon ve felç yer almaktadır (Benavides ve ark 2006). Enfeksiyon kapsamında ensefalit görülen en önemli lezyondur. Genellikle demyelinizasyon ile birlikte kronik nonpurulent meningoensefalomiyelit görülür. Koroid pleksusun, nöroparankim ve perivasküler katmanın mononükleer infiltrasyonu da görülebilir (Benavides ve ark 2009).

Maedi-Visna hastalığının solunum ve sinirsel formunun etkilediği hayvanlarda kronik enduratif mastitis ve ilerleyici arthrit görülebilmektedir (Blacklaws 2012, Pérez ve ark 2015). Klinik olarak koyunlarda memenin sertliği dikkat çekicidir ancak ağrılı değildir, süt veriminde azalmaya neden olmaktadır (Spickler 2015). Virusun memede bulunan makrofajlarda ve meme bezi epitel hücrelerinde replikasyonun neden olduğu lenfositik inflamatuvar sonucunda oluşan tahribat süt üretiminin azalmasına neden olmaktadır (Minguijón ve ark 2015, Kalogianni ve ark 2020). Maedi-Visna hastalığının neden olduğu arthrit klinik olarak daha az rastlanılan bir semptomdur (Spickler 2015, Pérez ve ark 2015). Sıklıkla karpal ve tarsal eklemlerde görülür. Metatarsal, metakarpal ve vertebral eklemlerde de görülebilmektedir (Christodouloupoulos 2006). Klinik belirtiler ve patolojik bozukluklar sinovyal membranın mononükleer hücre infiltrasyonu sebebiyle gelişmektedir. Bu nedenle eklem kapsülü ve sinovyal membranda gelişen konjesyon ile ödem sonucunda eklemlerde genişleme oluşmaktadır. Devam eden süreçte kıkırdak doku tahribatı ve klinik olarak topallık görülmektedir (Minguijón ve ark 2015, Gomez-Lucia ve ark 2018).

1.8. Teşhis

Small Ruminant Lentivirus enfeksiyonlarının tanısı için geniş uygulama alanı olan bir "altın standart" teşhis metodu belirtilmemektedir (Echeverría ve ark 2020). SRLV'nin mutasyonları, türler arası geçişi ve koyunların humoral yanıtları enfekte hayvanların tanımlanmasında dezavantaj oluşturmaktadır (Cardinaux ve ark 2013, Olech ve ark 2018). Maedi-Visna hastalığının teşhisi; klinik belirtileri, virolojik, moleküler ve serolojik yöntemler ile doğrulanabilmektedir (Chakraborty ve ark 2014). Epidemiyolojik çalışmalarda ve sürü taramalarında sıklıkla serolojik testlerden yararlanılmaktadır (OIE 2018).

Enfekte koyunlarda SRLV yönünden serokonversiyon geliştikten sonra antikor varlığı serolojik metotlar kullanılarak test edilebilmektedir (Herrmann-Hoesing 2010). Teşhis laboratuvarları tarafından AGID ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi sıklıkla kullanılan serolojik metotlardır (de Andrés ve ark 2005). AGID testi değişken sensitiviteye sahip olmasına rağmen spesifikliğı yüksek bir analiz metodu olarak belirtilmektedir (Varea ve ark 2001, Toft ve ark 2007, Brinkhof ve van Maanen 2007). Uygulamada serum örnekleri ile test antijeninin agar jelde 24-48 saatlik inkübasyonundan sonra presipitat çizgisinin varlığının ya da yokluğunun görsel

olarak değerlendirilmesi ile sonuçlandırılmaktadır (OIE 2018). Yapılışının pratikliği testin avantajı olarak ifade edilse de test süresi ve uygulayıcının deneyimine bağlı olarak sonuçların yorumlanması bu metodunun dezavantajı olarak ifade edilmektedir. Bu dezavantajları nedeni ile rutin tanıda yaygın kullanım alanı bulamamasına rağmen ELISA test sonuçlarının değerlendirmesinde bir konfirmasyon testi gibi kullanılabilir (Minguijón ve ark 2015). Bir diğer serolojik metot olan ELISA testi daha ekonomik bir metot olup serum örneklerinin yanı sıra plazma ve süt örneklerini de analiz kabiliyetine sahiptir (Mazzei ve ark 2005). ELISA testi çok sayıda örneğin kantitatif olarak test edilmesine imkân sağlamaktadır (Varea ve ark 2001). Bu özellikleri sayesinde epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Varea ve ark 2001, Mordasini ve ark 2006). Ancak SRLV'nin genetik değişimleri antijen çeşitliliğine ve yeni suşların oluşmasına neden olmaktadır (Cardinaux ve ark 2013, Olech ve ark 2018). Bundan dolayı farklı virus suşların antijenleri kullanılarak birçok indirekt ve yarışmacı ELISA geliştirilmiştir (Boshoff ve ark 1997, Fevereiro ve ark 1999, Saman ve ark 1999). Ancak yeni suşların ortaya çıkması süregelen bir durum olması nedeniyle testin spesifitesini olumsuz etkileyeceği belirtilmektedir (Ostuni ve ark 2021). Bu antijenik çeşitlilik diğer serolojik testleri de benzer şekilde etkilemektedir. AGID ve ELISA test metotları virus ile enfekte olmuş olan ancak henüz serokonversiyon gelişmeyen koyunları teşhis edememektedir (Varea ve ark 2001). Virusun genetik değişimleri ve koyunlarda geç gelişen serokonversiyonun yanlış negatif ve pozitif sonuçlara neden olacağı bildirilmektedir (Cardinaux ve ark 2013, Olech ve ark 2018).

Klinik veya subklinik vakalardan hazırlanan kan veya süt lökosit örnekleri koyun koroid pleksus hücre kültürlerinde virus izolasyonu için kullanılabilir (Suzuki ve ark 2017). Hücre kültürlerinde virus izolasyonu spesifik olmasına rağmen değişken sensitiviteye sahiptir. Nekropsi yapılan vakalarda ise akciğer, koroid pleksus, sinoviyal membran veya meme gibi etkilenen dokuların primer hücre kültürü olarak üretilmesi izolasyonun pratik bir yoludur (Barros ve ark 2004). Etkenin hücre kültürlerindeki sitopatolojik etkisi sinsitial dev hücre oluşumudur. Hücre kültüründe virus varlığı elektron mikroskobu ya da immün boyama teknikleri ile doğrulanabilmektedir (OIE 2018).

Small Ruminant Lentivirus enfeksiyonlarında nükleik asit varlığını saptamak için moleküler tanıda polimeraz zincir reaksiyonları [Polymerase chain reaction (PCR)] kullanılabilir (Herrmann-Hoesing ve ark 2007, Chakraborty ve ark

2014). PCR, farklı hücre veya dokulardaki viral nükleik asitleri saptamak ve ölçmek için yararlı olmasına rağmen, SRLV rutin tanısında kullanımı yaygın değildir. Periferik kan mononükleer hücresi [Peripheral blood mononuclear cells, (PBMC)], lökosit hücreleri, süt, akciğer, meme bezleri ve beyin örnekleri etkenin teşhisi için sıklıkla kullanılan numunelerdir. Düşük viral yük ve kanda viruslerin serbest olarak bulunmamasından dolayı süt ile defibrine kan örnekleri hücreleri ayırt edilerek moleküler analiz için değerlendirilmektedir (Preziuso ve ark 2003, Brellou ve ark 2007). Teşhis amacıyla LTR, pol, gag ve env gen bölgelerini hedef alan primerlerin kullanıldığı birçok konvensiyonel ve kantitatif PCR analiz yöntemi bulunmaktadır (Extramiana ve ark 2002, Eltahir ve ark 2006, Daltabuit-Test ve ark 2008 Brinkhof ve ark 2008, Leginagoikoa ve ark 2009, Gjerset ve ark 2009, Carrozza ve ark 2010, Barquero ve ark 2011, Brajon ve ark 2012, Olech ve ark 2012, Barquero ve ark 2013, De Regge ve Cay 2013, Kuhar ve ark 2013, Michiels ve ark 2018, Chassalevris ve ark 2020). Etkenin genomik heterojenitesi ve kullanılan yöntem çeşitliliği moleküler tanımlamada zorluklara neden olmaktadır (de Andrés ve ark 2005, Germain ve Valas 2006). PCR analizleri sensitivitesi yüksek analizler olup Real Time PCR metodu ile sensitivitesi arttırılabilmektedir. Bundan dolayı SRLV'nin teşhisinde PCR kullanımı için önemli olan testin spesifitesidir (de Andrés ve ark 2005). Konağın genomik DNA'sı yanlış pozitiflere neden olabileceği gibi evrensel kullanım alanı olan primerlerin kullanılmamasının yanlış negatiflik doğurabileceği unutulmamalıdır. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerde SRLV'nin nükleik asit varlığı restriksiyon enzimleri ve sekans analizleri ile kontrol edilmelidir (OIE 2018).

1.9. Koruma Kontrol

Koyunların SRLV enfeksiyonlarından korunmasına yönelik konakçının immun yanıt oluşturmaları için aşı çalışmaları bulunmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda koruyuculuğunun istenen düzeyde olmadığı söylenmektedir (Blacklaws 2012). SRLV enfeksiyonuna karşı test edilen birçok aşı çeşidinin sınırlı etkinlik göstermesi ve hatta bazı aşı çeşitlerinin hastalığın artmasına sebep olduğu belirtilmektedir (Torsteinsdottir ve ark 2007, Reina ve ark 2009, Blacklaws 2012). *Lentivirus* içerisindeki farklı etkenlere yönelik çalışılan birçok aşı içinde bu olumsuzluklara değinilmektedir (Kwong ve ark 2012).

Bazı lentiviral etkenler için anti-retroviral etkili ajanların kullanımı bilinmektedir (Olender ve ark 2012). Bu yöntemin teorik olarak SRLV enfeksiyonları

için test edilebileceği ifade edilmektedir. Ancak güncel olarak antiviral ajanlar ile tedavi SRLV enfeksiyonlarında belirtilmektedir. Antiviral ajanların SRLV enfeksiyonlarında kullanımı ekonomik açıdan n görülmemektedir (White ve Knowles 2013).

Koyunların SRLV enfeksiyonlarına karşı birçok mücadele yöntemi bulunmaktadır. Etkili mücadele yöntemlerinden biri laboratuvar testleri ile SRLV yönünden pozitif tespit edilen hayvanların sürüden çıkarılmasıdır (Houwers ve ark 1984). Bir diğer mücadele yöntemi ise laktojenik bulaşmayı önlemek için kuzuların doğumdan sonra ayrılmasıdır (Houwers ve ark 1983). Bu yöntemde vertikal bulaşma riski bulunmaktadır (Cross ve ark 1975, Cutlip ve ark 1981). Ancak pozitif hayvanların sürüden ayrılması ile vertikal bulaşma riskinin azaltılabileceği ifade edilmektedir. (White ve Knowles 2013). Belirtilen bu mücadele yöntemleri hastalıktan ari sürülerin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Reina ve ark 2009). Hastalığın sürü içerisinde yaygınlığını yetiştirme yöntemleri etkilemektedir. Kapalı barınaklar, bu barınaklardaki hayvan sayısı ve mera kullanımının sürü prevalansını etkilediği ifade edilmektedir (Leginagoikoa ve ark 2006, Leginagoikoa ve ark 2010, Lago ve ark 2012). Farklı mücadele yöntemleri kullanılarak birçok ülkede hastalığın eradikasyonu için çeşitli programlar oluşturulduğu ve belirli düzeylerde etkili olduğu gösterilmektedir (Reina ve ark 2009, Synge ve ark 2010). Ancak sürüden çıkarılan hayvanlar, sürülerin negatif hayvanlar ile ikame edilmesi ve laboratuvar testleri mücadelede ekonomik giderleri beraberinde getirmektedir. Bu ekonomik giderler nedeni ile bazı ülkeler ve yetiştiriciler eradikasyon programlarını sürdürmeyi tercih etmemektedir (Peterhans ve ark 2004). SRLV, hayvanların ve hayvansal ürünlerinin uluslararası ticareti üzerindeki ekonomik etkileri nedeniyle Dünya Hayvan Sağlığı rgt tarafından bildirim zorunlu karasal hayvan hastalıkları listesine dahil edilmiştir (Tumino ve ark 2022).

Koyun yetiştiriciliği açısından SRLV enfeksiyonlarının neden olduğu Maedi-Visna hastalığı; klinik sonuçları ve verim kaybı nedeni ile ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Marmara Bölgesi'nde yaygınlığı ile ilgili geniş veriler bulunmamaktadır. Bu alışma Marmara Bölgesi'nde SRLV enfeksiyonlarının varlığının ortaya konulması, enfeksiyonun teşhisinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması, koyun serum örneklerinden bölgedeki yaygınlığı tespit edilerek kan ile organ örneklerden elde edilen izolatların moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirildi.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışma için gerekli olan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü (04.11.2020 tarih ve E-71037622-604.01.01-3107125 sayılı yazısı) ile T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Enstitüsü Etik Kurul (28.10.2020 tarih ve 248 sayılı yazısı 08/2020 nolu) kararları ekte sunulmuştur.

Marmara Bölgesi'nde Balıkesir (n=60), Bilecik (n=21), Bursa (n=40), Çanakkale (n=45), Düzce (n=9), Edirne (n=20), İstanbul (n=20), Kırklareli (n=29), Kocaeli (n=4), Sakarya (n=20), Tekirdağ (n=20) ve Yalova (n=20) illerinde yer alan koyunculuk işletmelerinden Pendik Veteriner Enstitüsü'ne (PVKE) tahlil amacı ile gönderilen koyun örnekleri (serum, kan ve organ), toplamda 308 adet örnek kullanıldı.

2.1.1. Materyal

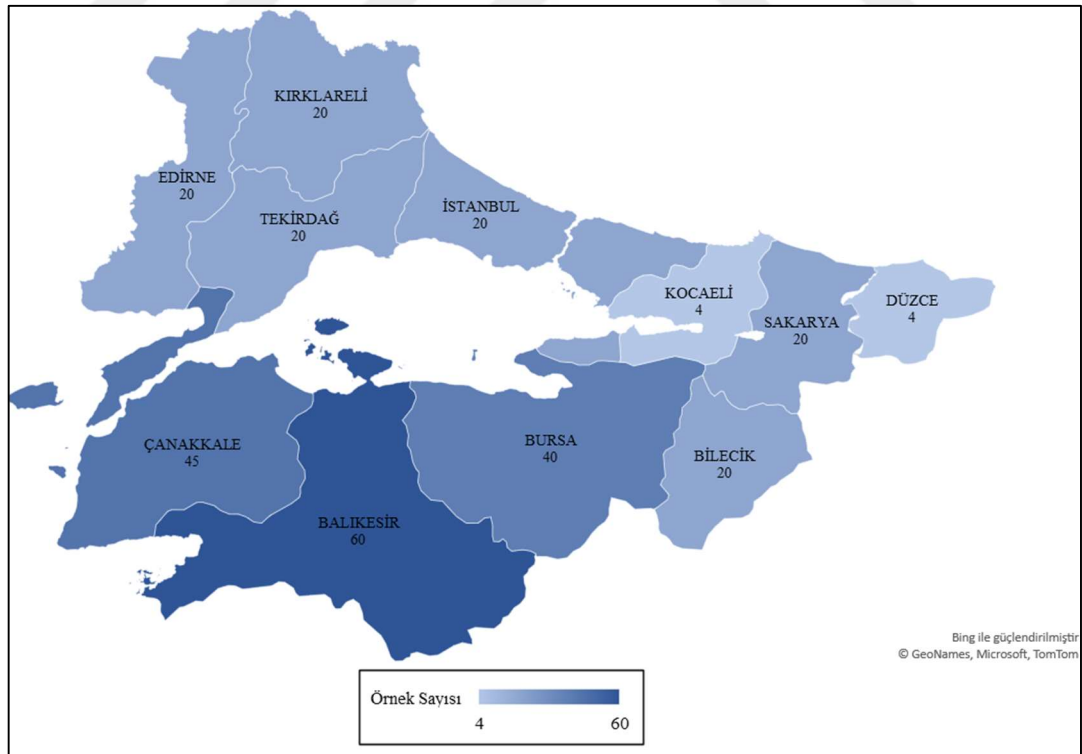
Soğuk zincir altında katkısız veya silikonlu steril tüpler ile gönderilen koyun kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri ve ependorf tüp ile gönderilen serum örnekleri serolojik analizleri gerçekleştirmek üzere -20°C soğutucularda muhafaza edildi. Hastalık şüphesiyle gönderilen organ örneklerinden hazırlanan inokulum -80°C derin dondurucuda muhafazası edildi. Defibrine kan örnekleri lökosit hücrelerinin ayrımı gerçekleştirilene kadar +4°C soğutucuda tutuldu. Lökosit hücreleri alındıktan sonra hücreler -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

Serolojik analizler için kullanılan örnekler bir işletmeden gönderilen numune sayısı ve farklı yaş dağılımı göz önünde tutularak seçildi. Serum örneklerinin gönderildiği il, işletme sayıları ve işletmeden gönderilen koyun örnek sayısı tablo ile gösterildi (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Serum örneklerinin il, işletme ve adet bilgileri.

Sıra No	Sürü Kod Numarası	İl	Koyun Serum Örnek Sayısı	Örnek Numaraları
1	İ10	Balıkesir	20	İ1001-20
2	E10	Balıkesir	21	E1001-21
3	K10	Balıkesir	19	K1001-19
4	11	Bilecik	20	1101-20
5	16	Bursa	20	1601-20
6	K16	Bursa	20	K1601-20
7	B17	Çanakkale	20	B1701-20
8	E17	Çanakkale	25	E1701-25
9	81	Düzce	4	8101-4
10	22	Edirne	20	2201-20
11	34	İstanbul	20	3401-20
12	39	Kırklareli	20	3901-20
13	41	Kocaeli	4	4101-4
14	54	Sakarya	20	5401-20
15	59	Tekirdağ	20	5901-20
16	77	Yalova	20	7701-7720

Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale, Düzce, Edirne, İstanbul, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya ve Tekirdağ illerinden gönderilen örneklerin dağılımı harita ile gösterildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Marmara Bölgesi'nden serolojik analiz için toplanan örneklerin dağılımı.

Hastalık şüphesiyle gönderilen ve moleküler analizler için kullanılan örneklerin materyal ve il bilgisi Tablo 2.2’de gösterildi.

Tablo 2.2. Moleküler analizler için kullanılan örneklerin il, materyal ve adet bilgisi.

Sıra No	Yıl	İl	Numune Tipi	Adet
1	2022	Kırklareli	Defibrine Kan	6
2	2022	Kırklareli	Akciğer	1
3	2022	Bilecik	Akciğer	1
4	2022	Düzce	Defibrine Kan	5
5	2021	Kırklareli	Defibrine Kan	1
6	2021	Kırklareli	Akciğer	1

2.1.2. Ticari Kitler

Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde kullanılan ticari kitlerin ad ve marka bilgileri tablo ile gösterildi (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Kullanılan ticari kitlerin ad ve marka bilgisi.

Ad	Marka
Maeditect 100 AGID test kiti	APHA, Weybridge, İngiltere
ID Screen MVV/CAEV Indirect ELISA test kiti	IDvet, Grabels, Fransa

2.1.3. Sarf Malzemeleri

Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde kullanılan sarf malzemelerinin ad ve marka bilgileri tablo ile gösterildi (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Kullanılan ticari kitlerin ad ve marka bilgisi.

Ad	Marka
Agaroz	Prona, EU
EDTA	Merck, Almanya
Etidyum bromür	Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Mutlak etanol	Merck, Almanya
Tris HCL	Merck, Almanya
Tris base	Merck, Almanya
DNA marker	Fermentas, Litvanya
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye	GriSP, Portekiz

2.1.4. Cihaz, Makine ve Teçhizat

Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde kullanılan makine, teçhizat ve cihazların ad ve marka bilgileri tablo ile gösterildi (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Kullanılan makine, teçhizat ve cihazların ad ve marka bilgisi.

Cihaz	Marka Ve Menşei
Vida Kapaklı Borosiliat Cam Şişe 500-1000 ml	Isolab, Almanya
Mavi Kapaklı Laboratuvar Şişesi 100 ml	Schott Duran, Almanya
Cam Mezür 1000mlKavalier Çekya	Kavalier, Çekya
GFL 1083 Su Banyosu	Thermolab, Almanya
Tıbbi Atık Kutusu 5 lt	Telkar, Türkiye
Indimag 48 Otomatik Ekstraksiyon Cihazı	Indical Bioscience, Almanya
Magna Lyser Homojenizatör Cihazı	Roche, İsviçre
Mikro 22 R Mikro Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Almanya
PCR Thermal Cycler T100	Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri
Etüv	Heraeus Instruments, Almanya
Derin Dondurucu (-20)	Philco, Amerika Birleşik Devletleri
Combi-Spin Mini Santrifüj/Vorteks	Biosan, Letonya
Tek Kanallı Otomatik Pipet 2-20 ml	Dlab, Scientific Çin
Tek Kanallı Otomatik Pipet 1-10 ml	Eppendorf Research, İngiltere
Buzdolabı (+4 °C /-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Wisecryo Derin Dondurucu (-80 °C)	Daihan Scientific, Güney Kore
Surround-Flow Buzdolabı (+4 °C /-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Analitik Terazı	Precisa, İsviçre
Vortex	Heidolph Reax, Almanya
Pipet Pompası 0.1-100	Onilab, Amerika Birleşik Devletleri
Elektronik Çok Kanallı Pipet	Rainin, Amerika Birleşik Devletleri
UV Transilluminators	Vilber Lourmat, Fransa
Polymax 1040 Dalgalı Platform Çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
İnkübatör 1000 – Yüksek Kapaklı	Heidolph, Almanya
Mikro 120 Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Almanya
Multiscan Spectrum Spektrofotometre Cihazı	Thermo Labsystem, Finlandiya
Mikrodalga Fırın	Arçelik, Türkiye
Elektroforez Güç Kaynağı EC250-90	Thermo, Amerika Birleşik Devletleri
Minicell Primo Elektroforez Tankı	Thermo, Amerika Birleşik Devletleri
Laminar Flow	Heraeus, Almanya

2.1.5. Test Kontrolleri

Moleküler analizlerin optimizasyonunda ve PCR analizlerinde pozitif kontrol amacıyla TR-Yalova-2016 (MN186564) izolatı kullanıldı. PCR analizlerinde negatif kontrol olarak distile su kullanıldı. ID Screen MVV/CAEV Indirect ELISA test kiti (Idvet, Grabels, Fransa) pozitif ve negatif kontroller içerdiği için kit prosedürü uygulandı. Maeditect 100 AGID test kiti (APHA, Weybridge, İngiltere) bileşenleri içerisinde antijen ve pozitif serum bulunmaktadır. AGID test için negatif kontrol amacıyla fötal dana serumu (Euroclone, Güney Amerika) kullanıldı.

2.2. Yöntem

2.2.1 Serum Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında; katkısız veya silikonlu steril tüpler ile gönderilen koyun kan örneklerinden serum hazırlaması geçen süreye kadar uygun koşullarda (+4°C'lik soğutucularda) muhafaza edildi. Tüpler, tüp godeli santrifüj cihazında 2500 rpm [dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)] 20 dk santrifüj edildi. Örnekler santrifüj edildikten sonra kan pıhtısı ile ayrılan serum otomatik pipet yardımıyla 1.5 ml hacimli steril eppendorf tüplere porsiyonlandı. Eppendorf tüpler kapaklı mikro tüp standı içine dizildi. Test edilinceye kadar -20°C soğutucularda muhafaza edildi.

2.2.2. Lökosit Örneklerinin Hazırlanması

Antikoagülan içeren steril tüplere alınarak hazırlanan defibrine kan örnekleri santrifüj edilinceye kadar uygun koşullarda (+4°C'lik soğutucularda) muhafaza edildi. Tüp içerisindeki kan örnekleri tüp godeli santrifüj cihazında 2000 rpm +4°C'de 20 dk santrifüj edildi. Lökosit tabakası otomatik pipet yardımıyla 1.5 ml hacimdeki steril eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüpler -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.3. Organ Doku Örneklerinin Hazırlanması

Soğuk zincir altında gönderilen doku ve organ numuneleri biyogüvenlik kabini (Holten HWR 2448) içerisinde steril bistüri ile steril tek kullanımlık bistüri ucu kullanılarak steril petri kaplarında parçalanarak 1 gram hacimde alındı. Hazırlanan örnek boncuklu tüplere 1/2 hacimde olacak şekilde Fosfat Buffered Saline (PBS) ilave edilip MagNA Lyser cihazında 6000/dk'da 1 dk homojenize edildi. Homojenizat ve PBS 2/10 oranında 15 ml konik tüplere alındı. Vorteks uygulandıktan sonra 3000

devirde 4°C’de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Santifüj sonrası elde edilen süpernatant 1.5 ml’lik steril eppendorf tüpe aktarıldı ve -80°C derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.4. ELISA Testi

Koyun ve keçilerde VMV ve CAEV antikorlarına yönelik ticari ID Screen MVV/CAEV Indirect (IDvet, Grabels, France) ELISA kiti ile serum örnekleri incelendi. Tablo 2.6’da kit bileşenleri belirtildi.

Tablo 2.6. Kit bileşenlerinin bilgisi.

Kit Bileşenleri
MVV/CAEV sentetik peptitler kaplı mikrolept
Konsantre Konjugat (10X)
Pozitif kontrol
Negatif kontrol
Seyreltme Tamponu 16
Seyreltme Tamponu 3
Yıkama Konsantresi (20X)
Substrat Solüsyonu (TMB)
Stop Solüsyonu (0.5 M)

Yıkama konsantresi (20X) kit prosedüründe belirtilen ölçütlerde testin hemen öncesinde yıkama solüsyonu (1X) olarak hazırlandı. Yıkama konsantresi (20X) 24°C’de 30 dk inkübatör bekletildi. Daha sonra vorteks ile çalkalandı. Yıkama konsantresi 1/20 hacminde olacak ölçüde steril 1 L hacimde vida kapaklı cam laboratuvar şişesinde distile su ilave edilerek yıkama solüsyonu hazırlandı. Şişe çalkanarak test sırasında inkübatörde bekletildi.

Test edilecek numuneler ile kullanılacak miktarda kit bileşenleri 24°C da 45 dk bekletildi. ELISA testi aşağıda belirtilen aşamalar sırasıyla takip edilerek uygulandı.

- Seyreltme tamponu 16 kuyucuklara 190 µl hacimde 8 kanallı otomatik pipet ile eklendi.

- Kuyucuklara serum ile birlikte pozitif ve negatif kontroller 10 µl hacminde eklendi.
- Mikropleyt alüminyum folyo temas etmeyecek şekilde kapatıldı ve 45 dk 21°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca mikropleyt inkübatörün plaka çalkalayıcı bölümde çalkalandı.
- İnkübasyon sonunda mikropleyt kuyucukları boşaltıldı. Her kuyucuğa 8 kanallı otomatik pipet ile 300 µl yıkama solüsyonu (1X) eklendi ve 2 dk beklendi. Daha sonra mikropleyt kuyucukları boşaltıldı. Yıkama işlemi 300 µl yıkama solüsyonu (1X) ile 2 kere daha solüsyon bekletilmeden tekrar edildi.
- Konsantre konjugat (10X) seyreltme tamponu 3 ile 1/10 hacimde seyreltilerek konjugat (1X) hazırlandı.
- Her kuyucuğa 100 µl konjugat 1X eklendi.
- Mikropleyt kapatılarak 30 dk 24°C'de inkübe edildi.
- Mikropleyt kuyucukları boşaltıldı. Yıkama işlemi 300 µl yıkama solüsyonu (1X) ile 3 kere tekrar edildi.
- Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklendi.
- Mikropleyt kapatılarak 15 dk 24°C'de karanlıkta inkübe edildi.
- Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu (0.5 M) eklendi.
- Test edilen bütün örnekler ve kontroller optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda otomatik ELISA okuyucuda okutularak alındı.

Kit prosedüründe belirtilen testin validasyon kriterleri aşağıda belirtildiği gibi hesaplandı.

- Pozitif kontrollerin ortalama OD değeri (ODpk)'nin 0.350'den büyük olması gerekmektedir. **ODpk>0.350**
- Pozitif ve negatif kontrollerin (ODpk ve ODnk) ortalama OD değerlerinin oranı 3'ten büyük olması gerekmektedir. **ODpk/ODnk >3**

Validasyon kriterlerini sağlayan testin yorumlanması aşağıda belirtilen hesaplamalar ile yapıldı.

- Her örnek (ODs) için S/P yüzdesini (%S/P) aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı.

$$\%S/P = \frac{ODs - ODnc}{ODpk - ODnc} \times 100$$

- %S/P değeri hesaplanan örnekler aşağıda belirtilen yüzde değer ölçütleri baz alınarak negatif/şüpheli/pozitif olarak Tablo 2.7 kullanılarak değerlendirildi.
- %S/P değeri %50'ye eşit veya altında ise negatif kabul edildi.
- %S/P değeri %50 ile %60 arasında ise şüpheli kabul edildi.
- %S/P değeri %60'a eşit ve üzerinde ise pozitif kabul edildi.

Tablo 2.7. ELISA test sonuçlarını değerlendirme tablosu.

%S/P Değeri	Sonuç
S/P % ≤ 50%	NEGATİF
50% < S/P % < 60%	ŞÜPHELİ
S/P % ≥ 60%	POZİTİF

2.2.5. Agar Jel İmmunodifüzyon Testi

Araştırmada ticari Maeditect 100 AGID test kiti (APHA, Weybridge, İngiltere) kullanıldı. Kit içeriğinde antijen (1ml x 1) ve pozitif kontrol olarak antiserum (1ml x 3) bulunmaktadır. OIE (2018) tarafından bildirilen metot ile pH 7.2'de 0.05 M Tris ve %8 NaCl içinde %1 Agaroz hazırlandı. Hazırlanan agar jel otoklavize edildi. Otoklavdan sonra agar jel 3.5 ve 8.5 cm çapındaki petrilere aktarıldı. Petriler +4°C'lik soğutucularda bir gece bekletildi. Bu süre sonunda petri içindeki agar jel katılaştı. Agar delici ile antijen için bir adet kuyucuk açıldı ve bu açılan kuyucuk tam orta nokta kabul edilerek periferinde eşit uzaklıkta serum için 6 adet daha kuyucuk açıldı. Orta noktada açılan kuyucuğa 30 µl antijen steril pipet ile eklendi. Serum kuyucuklarına en az bir adet pozitif kontrol ve negatif kontrol eklendi. Diğer kalan gözlere serum örnekleri eklendi. İnkübasyon öncesi 8.5 cm çapındaki petrinin görüntüsü Şekil 2.2.'de gösterilmektedir. Pleytler 24 saat süre 20-25°C'de nemli bir ortam oluşturmak için bir kap içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan presipitin hatları kontrol edildi. Bu ilk kontrolden sonra 24 saat süre ile +4°C'lik soğutucularda tekrar inkübe edildi. Bu sürenin sonunda presipitin hatları tekrar kontrol edildi. Pozitif kontrolde presipitin hattını bulunması negatif kontrollerde bulunmaması durumlarında serum örnekleri

değerlendirmeye alındı. Presipitin hatları gösteren örnekler pozitif, göstermeyenler negatif olarak değerlendirildi.



Şekil 2.2. Agar jelin inkübasyon öncesi görüntüsü.

2.2.6. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

PVKE Viroloji Laboratuvarına Maedi-Visna hastalığı yönünden analiz için gönderilen koyun defibrine kan ve organ numuneleri konvansiyonel PCR yöntemi ile test edilmektedir. Maedi-Visna hastalığı şüphesi ile gönderilen numunelere 2021 ve 2022 yıllarında ticari IndiMag Pathogen Kit (INDICAL BIOSCIENCE, Leipzig, Almanya) ile otomatik ekstraksiyon cihazında viral DNA/RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kullanılan kitin içeriği aşağıdaki Tablo 2.8’de belirtildi.

Tablo 2.8. Ekstraksiyon kit bileşenlerinin bilgisi.

Stok Solüsyonlar
Buffer VXL
Buffer ACB
Proteinase K
Carrier RNA (poly A)
MagAttract Suspension G
Buffer AW1 (concentrate)
Buffer AW2 (concentrate)
Buffer AVE

Kit prosedüründe belirtilen Buffer VXL, Proteinase K, Buffer AVE ve MagAttract Suspension G stok solüsyonları çalışma solüsyonları olarak kullanılmaktadır. Buffer ACB, Carrier RNA (poly A), Buffer AW1 (concentrate) ve Buffer AW2 (concentrate) ise konsantre stok solüsyonlardır. Tablo 2.9’da konsantre stok solüsyonlarının çalışma solüsyonu olarak hazırlanmasında kullanılan kimyasalların bilgisi verildi.

Tablo 2.9. Stok solüsyon ve ek kimyasalların bilgisi.

Stok Solüsyon	İlave Kimyasallar
Carrier RNA (poly A)	Buffer AVE
Buffer ACB	İsopropanol
Buffer AW1 (concentrate)	Etanol
Buffer AW2 (concentrate)	Etanol

Ekstraksiyon işleminden önce örnekler oda sıcaklığında (25°C) çözdürüldü. Ekstraksiyonu yapılacak örnek 200 µl hacimde alınarak prosedürün 3. etabında kullanılmak üzere Buffer VXL Karışımı Tablo 2.10’a göre hazırlandı. MagAttract Suspension G’yi eklemeyen önce 3 dk vorteks kullanılarak karıştırıldı.

Tablo 2.10. Bir örnek için Buffer VXL karışımı için gerekli olan reaktifler.

Solüsyonlar	Miktar
Buffer VXL	100 µl
Buffer ACB	400 µl
MagAttract Suspension G	25 µl
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl

- **Prosedür 1. etap** pleytin 1. sırasına 20 µl Proteinase K eklendi.
- **Prosedür 2. etap** pleytin 1. sıraya 200 µl örnek eklendi.
- **Prosedür 3. etap** pleytin 1. 2. 3. 4. sıralarına Tablo2.11’de belirtilen solüsyonlar eklendi.

Tablo 2.11. Ekstraksiyon pleytinin sırasıyla kuyucuklarına eklenen solüsyon bilgisi.

Sıra	Sıra İşlemi	Solüsyon	Miktar
1	Lysate	Lysate*	720 µl
2	Wash 1	Buffer AW1	700 µl
3	Wash 2	Buffer AW2	700 µl
4	Elution	Buffer AVE	100 µl

*Lysate 20 µl Proteinase K, 200 µl örnek ve 500 µl Buffer VXL karışımı içermektedir

Prosedürün 3. Etabından sonra plastik pleyt kuyucuklarının solüsyon içerikleri Tablo 2.12’de gösterildi.

Tablo 2.12. Ekstraksiyon cihazına yüklemeye hazır pleyt kuyucuklarının solüsyon içeriği.

	1.Lysate	2.Wash 1	3.Wash 2	4.Elution
A	20 µl Proteinase K 200 µl örnek 500 µl Buffer VXL	700 µl Buffer AW1	700 µl Buffer AW2	100 µl Buffer AVE

Plastik pleyt bu aşamadan sonra otomatik ekstraksiyon cihazına yüklendi. 40 dk içerisinde ekstraksiyon işlemini tamamlandıktan sonra elution içerisindeki nükleik asit 1.5 ml eppendorf tüplere alındı. Spektrofotometre ile nükleik asit miktarı

belirlendi. Analiz edilecek miktarda nükleik asit alındı ve analiz süresince (+4°C’lik soğutucularda) bekletildi.

2.2.7. Polimerase Chain Reaction

Ekstraksiyon işleminden sonra spektrofotometre ölçümü sonrası istenilen değerlere sahip nükleik asit PCR analizine alındı. Aksi bir durumda ekstraksiyon işlemi tekrarlandı. Örneklerden elde edilen nükleik asit, ticari kit Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye (GRiSP, Portekiz) kullanılarak, hastalık yönünde viral DNA varlığı PCR analizi ile araştırıldı. PCR optimizasyonu ve analizinde Extramania ve ark. (2002) tarafından bildirilen LTR gen bölgesine yönelik primerler kullanıldı. Primer dizinleri ve pozisyonları aşağıdaki Tablo 2.13’de gösterildi.

Tablo 2.13. LTR gen bölgesine yönelik kullanılan primer dizinlerinin bilgisi.

Primerler	Primer Dizinleri	Ürün Boyutu	Kaynak
LTR2a (forward)	5'-TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG-3' Pozisyon (153-176)	291 (bp)	Extramania ve ark 2002
LTR2s (reverse)	5'-CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA-3' (Pozisyon: 8990-9013)		

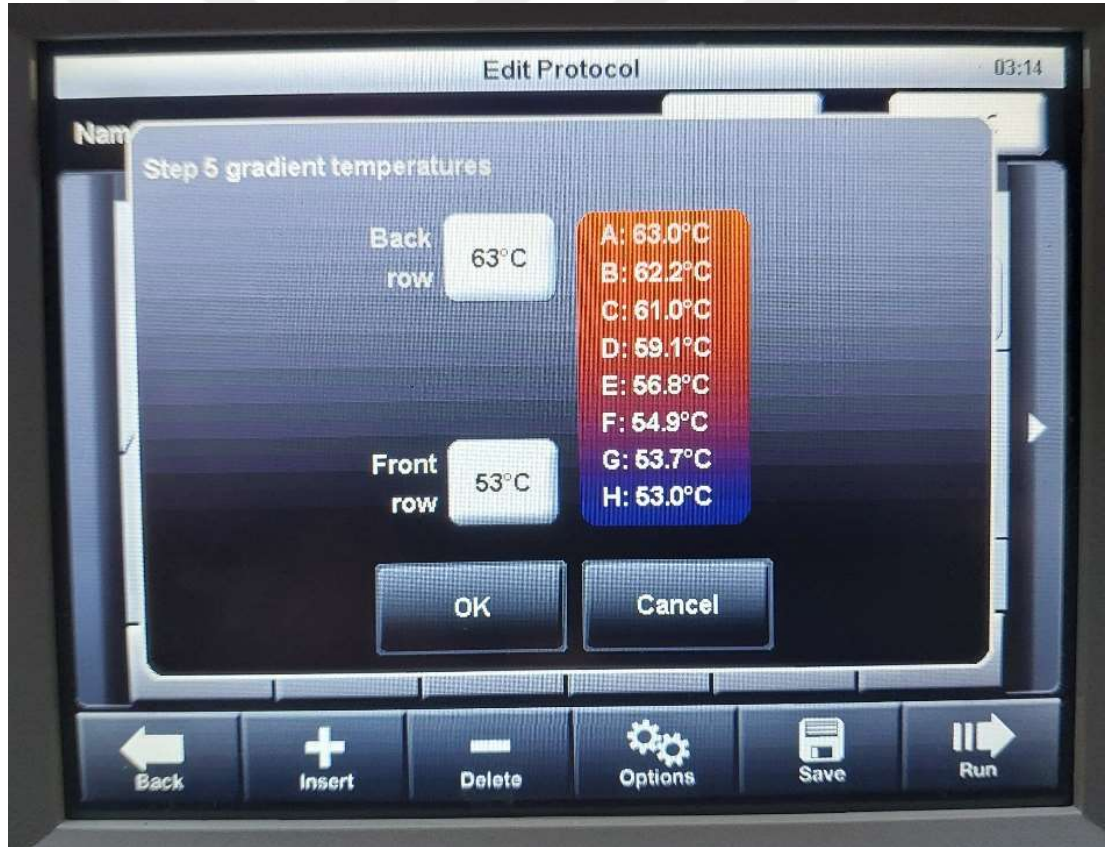
PCR optimizasyonu için aktivasyon ısısı (Activation), denatürasyon (Denaturation) ısısı, uzama ısısı (Extension) ve son uzama ısısı (Final Extension) ticari kitin prosedüründe önerilen değerler baz alındı. Bağlanma ısısı (Annealing) için primer dizinlerinin erime ısısı [T_m (melting temperature)] Tablo 2.14’de gösterilen formül ile belirlendi (Wallace ve ark 1979). Belirlenen T_m değerinden ±2°C ısı derecelerinde gradient PCR yapıldı. Annealing ısısı 59°C olarak bulundu. Belirtilen ısı değerinde tespit limiti log 10 tabanın pozitif kontrolün sulandırması yapılarak belirlendi.

Tablo 2.14. Primer dizinlerinin Tm değeri hesaplama tablosu.

Formül		Kaynak			
$Tm=64.9 +41x(G+C-16.4)/(A+T+G+C)$		Wallace ve ark (1979)			

Primerler	Primer Dizinleri	Baz Adeti				Tm Değeri
		G	C	T	A	
LTR2a	TGACACAGCAAATGTAACCGCAAG	5	6	3	10	55.675°C
LTR2s	CCACGTTGGGCGCCAGCTGCGAGA	9	8	3	4	65.925°C

Gradient PCR analizi 63°C ile 53°C arasındaki değerlerde yapıldı. PCR Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, ABD) cihazının gradient protokolünde kuyucuklar için belirlediği ısı değerleri Şekil 2.3’de gösterildi.



Şekil 2.3. Gradient PCR analizi ısı değerleri.

PCR optimizasyonu sonrası analizde kullanılan ısı protokolü ve analiz bileşenleri aşağıdaki Tablo 2.15’de gösterildi.

Tablo 2.15. PCR analizi bileşenleri ve ısı protokol bilgisi.

Analiz Bileşenleri		Isı Protokolü			
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X) with dye	12.5	Activation	95°C	3 dk	1
Forward primer (10 pmol/ µl)	1	Denaturation	95°C	1 dk	
Reverse primer (10 pmol/ µl)	1	Annealing	59°C	1 dk	34
Dnase/Rnase Free Su	5.5	Extension	72°C	1 dk	
DNA	5	Final Extension	72°C	10 dk	1
Toplam	25	Cool	4°C		1

2.2.8. PCR ürünlerinin elektroforezi

Her örneğin PCR sonucunda elde edilen ürünü agaroz jel elektroforezi kullanılarak değerlendirildi. Beklenen ampikon boyutunun 291 bp [Baz çifti (Base pair)] olmasından dolayı Tris/Borate/EDTA (TBE) tampon ve %1.5’luk agaroz jel kullanılması tercih edildi (Ven ve Rani 2012). Bu amaçla;

- TBE tampon stok solüsyonu (5X) hazırlandı. Hazırlanan 5X TBE tampon solüsyonu 1/10 hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 0.5X TBE çalışma solüsyonu hazırlandı. Bileşenler Tablo 2.16.’da gösterildi.

Tablo 2.16. Tampon çözeltinin bileşen bilgisi.

Bileşenler	Miktar	Hazırlanan Solüsyon
Tris Base	54 g	5X TBE tampon
Borik Asit	27.5 g	
0.5M EDTA (pH 8.0)	20 ml	
Distile Su	1000 ml hacme tamamlanır	
5XTBE tampon	100 ml	0.5X TBE tampon
Distile Su	900 ml	

- Agaroz 0.6 gr olarak hassas terazide tartıldı. Cam erlenmayer içerisine 40 ml 0.5X TBE tampon ile birlikte mikrodalga fırın kullanılarak çözdürüldü. Çözeltiye 0.5 µg/ml olacak hacimde Ethidium Bromide (EtBr) (Sigma, Almanya) ilave edildi. Daha sonra tarak yerleştirilmiş jel kasetine döküldü. Jelin donması için 30 dk beklendikten sonra tarak çıkartıldı.
- Jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı sınır çizgilerine kadar 0.5X TBE tampon eklendi. İlk ve son agaroz jel kuyularına 100 bp DNA Ladder 6 µl olarak yüklendi. Agaroz jel kuyularına örnekler, pozitif ve negatif kontrol 6 µl olarak pipet ile yüklendi. PCR aşamasında kullanılan mastermix yükleme boyası içerdiği için yükleme direkt yapıldı.
- Elektroforez tankı kapatıldı ve güç kaynağı (100 V ve 50 mA) ayarlandı ve 60 dk jelde yüklenen PCR ürünleri yürütüldü. Süre bitimini takiben jel UV ışık yardımıyla değerlendirildi. Oluşan jel görüntüsünün fotoğrafları çekildi.

2.2.9. Amplikonların Saflaştırılması

Pozitif tespit edilen örneklere ait amplikona DNA diziliminden önce saflaştırma işlemi uygulandı. Jel üzerindeki pozitif bantlar steril bir bistüri yardımıyla kesildi. Kesilen kısım steril 200 µl filtreli pipet ucuna aktarıldı. Pipet ucu kesilerek 1.5 ml hacimde eppendorf tüpe alındı. Eppendorf tüp 15 saniye 10000 rpm devirde santrifüj edildi (Yang ve ark 2013). Eppendorf tabanında toplanan amplikon DNA dizilimin işlemine kadar -20°C’de muhafaza edildi.

2.2.10. DNA Dizin Analizi

Amplikonların saflaştırılmasından sonra DNA dizileme analizleri yapıldı. Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzers (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanılarak Sanger dizileme yapıldı.

2.2.11. Sanger Dizileme Analizinin Değerlendirilmesi ve Filogenetik Analiz

Sanger dizileme ile elde edilen ham veriler Molecular Evolutionary Genetics Analysis 1.1 (MEGA1.1) yazılımı (Tamura ve ark 2004) kullanılarak görüntülendi. MEGA1.1 yazılımının TraceEditor işlevi ile Web Tarayıcısı üzerinden National Center for Biotechnology Information (NCBI) internet açık erişim kaynağı tarafından sağlanan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programından ham dizinlerin aramaları yapıldı. Program veri tabanında kayıtlı olan nükleotit dizinlerine erişim

sağlayarak benzer dizinler kontrol edildi. Bu sayede elde edilen ham veri dizinlerinin kromatogramları değerlendirildi. Kromatogramların düzenlenmesi TraceEditor işlevi ile yapıldı ve elde edilen dizinler Alignment Explorer işlevine aktarıldı. Alignment Explorer işlevi ile forward ve revers dizinlerin hizalaması yapıldı. Hizalama sonrası FASTA formatında kaydedildi.

Filogenetik analizler için referans dizinler GenBank NCBI veri tabanından elde edildi (Benson ve ark 2013). MEGA11 yazılımının Alignment Explorer işlevine aktarılan bütün dizinlere Muscle yöntemiyle hizalamaları yapıldı. Filogenetik ağaçları oluşturmak için Maximum Likelihood metodu ve Kimura 2 parametrelili model seçildi (Kimura 1980). Beş oran kategorisine sahip gama dağılımı (+G) ve 1000 bootstrap uygulandı (Tamura ve ark 2021). Elde edilen filogetik ağaç ile dizinler karakterize edildi. Filogenetik analizlerde kullanılan referans dizinler Tablo 2.17’de, ülke izolat dizinleri ise Tablo 2.17’de sunuldu.

Tablo 2.17. Filogenetik analizlerde kullanılan referans dizinler.

Genbank Erişim Kodu	Suş Adı	Genotip	Kaynak
M10608	Icelandic LV1-1	A	Sonigo ve ark (1985)
M60609	Icelandic 1514	A	Sonigo ve ark (1985)
MG554402	SRLV001	B	Colitti ve ark (2019)
JF502417	Volterra	B	Bertolotti ve ark (2011)
AY900630	Gansu	B	Wang ve ark (2022)
M33677	Clements	B	Saltarelli ve ark (1990)
FJ195346	Ov496	B	Glaria ve ark (2009)
JF502416	Fonni	B	Bertolotti ve ark (2011)
AF322109	1GA	C	Gjerset ve ark (2006)
EU293537	Roccaverano	E	Reina ve ark (2009)
GQ381130	Seui	E	Reina ve ark (2010)

Tablo 2.18. Filogenetik analizlerde kullanılan ülke izolat dizinleri.

Ülke	Genbank Erişim Kodu	Kaynak
Yunanistan	DQ084444	Angelopoulou ve ark (2006)
	DQ647677	
	DQ647681	
	GQ862786	
Türkiye	GQ862789	Muz ve ark (2013)
	GQ862799	
	GQ862800	
	GQ862801	
ABD	HM053096	Broughton-Neiswanger ve ark (2010)
	HM053108	
	HM053397	
	MK188369	
Meksika	MK188370	Mendiola ve ark (2019)
	MK188371	
	ON637545	
	ON637547	
	ON637551	
	ON637554	
	ON637559	
	ON637561	
	ON637562	
	ON637566	
	ON637568	
	ON637574	
Polonya	ON637577	Olech ve ark (2022)
	ON637579	
	ON637582	
	ON637583	
	ON637584	
	ON637585	
	ON637587	
	ON637588	
	ON637589	
	ON637590	
	ON637591	

2.2.12. İstatistiksel Yöntem ve Analiz

AGID ve ELISA testi arasındaki uyum kappa istatistiği kullanılarak değerlendirildi. Kappa istatistiğinin hesaplanmasında web tabanlı EpiTools yazılımı (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=home>) kullanıldı.

AGID ve ELISA testlerinin karşılaştırmalı değerlendirilmeleri birbirini referans alınarak yapıldı. Referans değerler elde edilen sonuçlardan oluşturulan 2x2 tablo ile elde edildi (OIE 2018). Sensitivite, spesifite, doğruluk oranı, pozitif prediktif değeri (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) Tablo 2.19’de gösterilen formüller ile hesaplandı (Beguería 2006, Velez ve ark 2007).

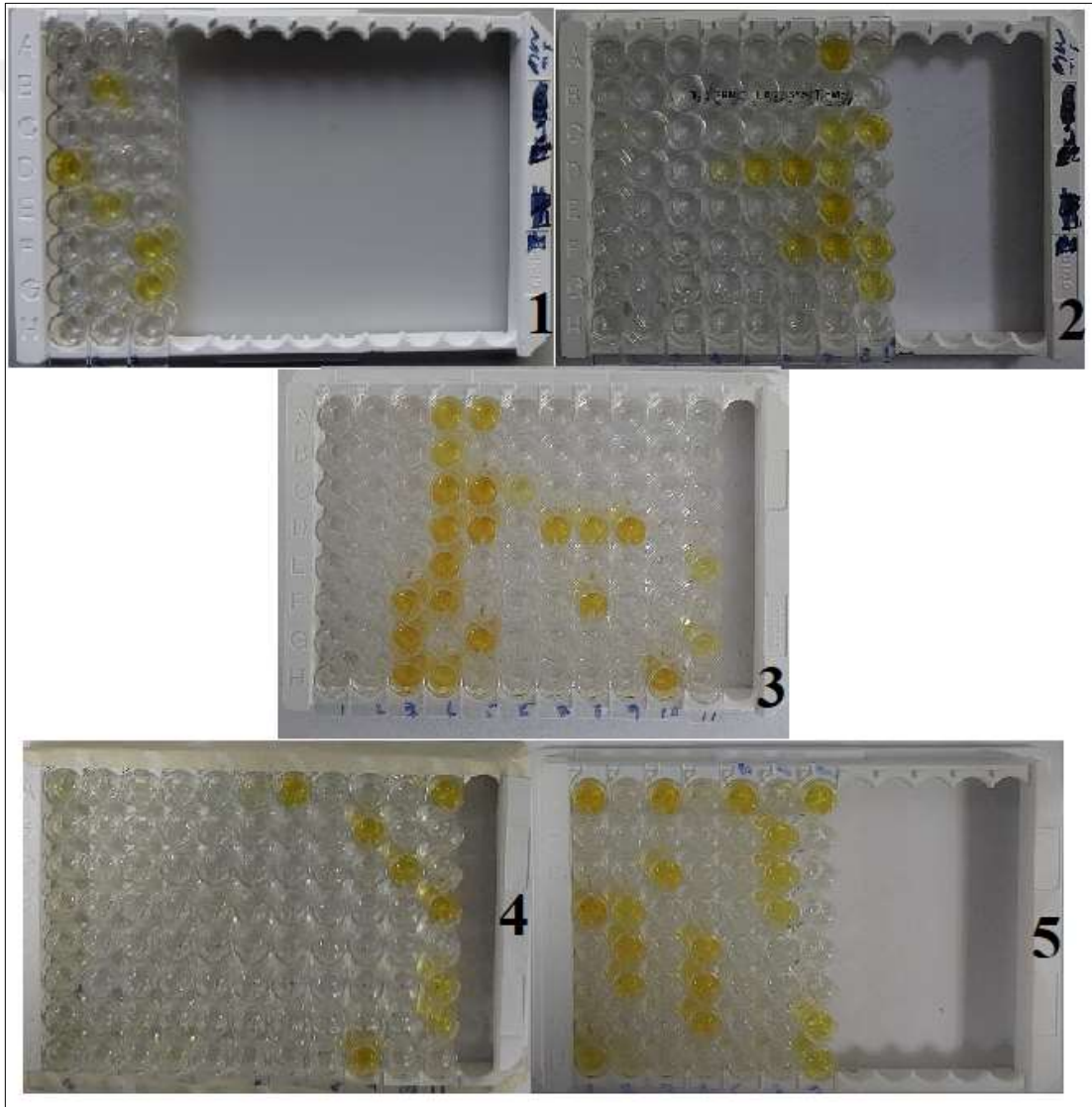
Tablo 2.19. Test değerlendirme parametrelerinin hesaplama tablosu.

		Referans Test	
		Pozitif (+)	Negatif (-)
Test Sonuçları	Pozitif (+)	Doğru Pozitif (DP)	Yanlış Pozitif (YP)
	Negatif (-)	Yanlış Negatif (YN)	Doğru Negatif (DN)
Test Değerlendirme Parametreleri		Formül	
Sensitivite (%)		$\frac{DP}{DP + YN} \times 100$	
Spesifite (%)		$\frac{DN}{YP + DN} \times 100$	
PPD (%)		$\frac{DP}{DP + YP} \times 100$	
NPD (%)		$\frac{DN}{(DN + YN)} \times 100$	
Doğruluk Oranı (%)		$\frac{DP + DN}{DP + YP + YN + DN} \times 100$	

3. BULGULAR

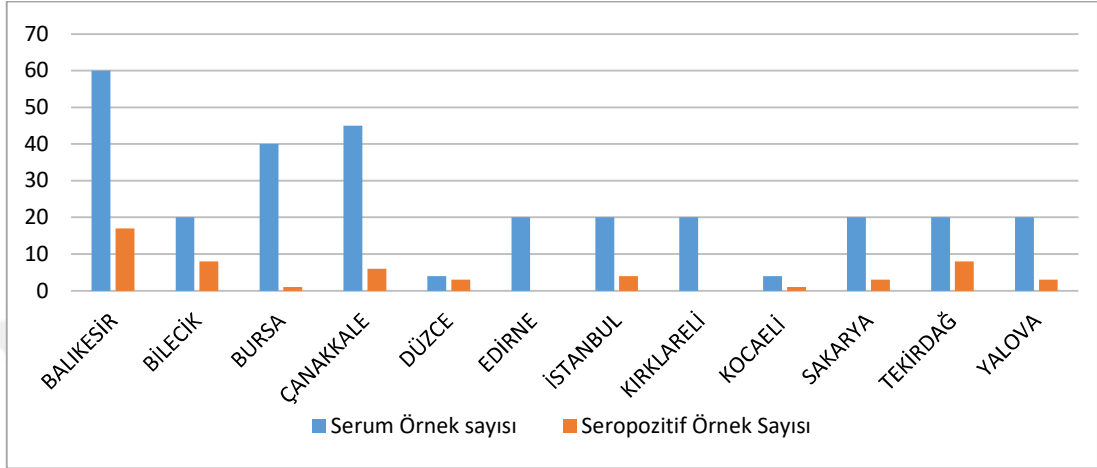
3.1. ELISA Test Sonuçları

Marmara Bölgesi'nde Balıkesir (n=60), Bilecik (n=20), Bursa (n=40), Çanakkale (n=45), Düzce (n=4), Edirne (n=20), İstanbul (n=20), Kırklareli (n=20), Kocaeli (n=4), Sakarya (n=20), Tekirdağ (n=20) ve Yalova (n=20) illerinde yer alan koyunculuk işletmelerinden gönderilen toplam 293 adet koyun serum örneklerinden 54 adet örnek SRLV enfeksiyonu yönünden seropozitif tespit edildi. Marmara Bölgesi'nde SRLV enfeksiyonun seroprevalans oranı %18.43 olarak hesaplandı. Çalışmadaki ELISA test pleytlerinin görüntüsü Şekil 3.1'de verildi.

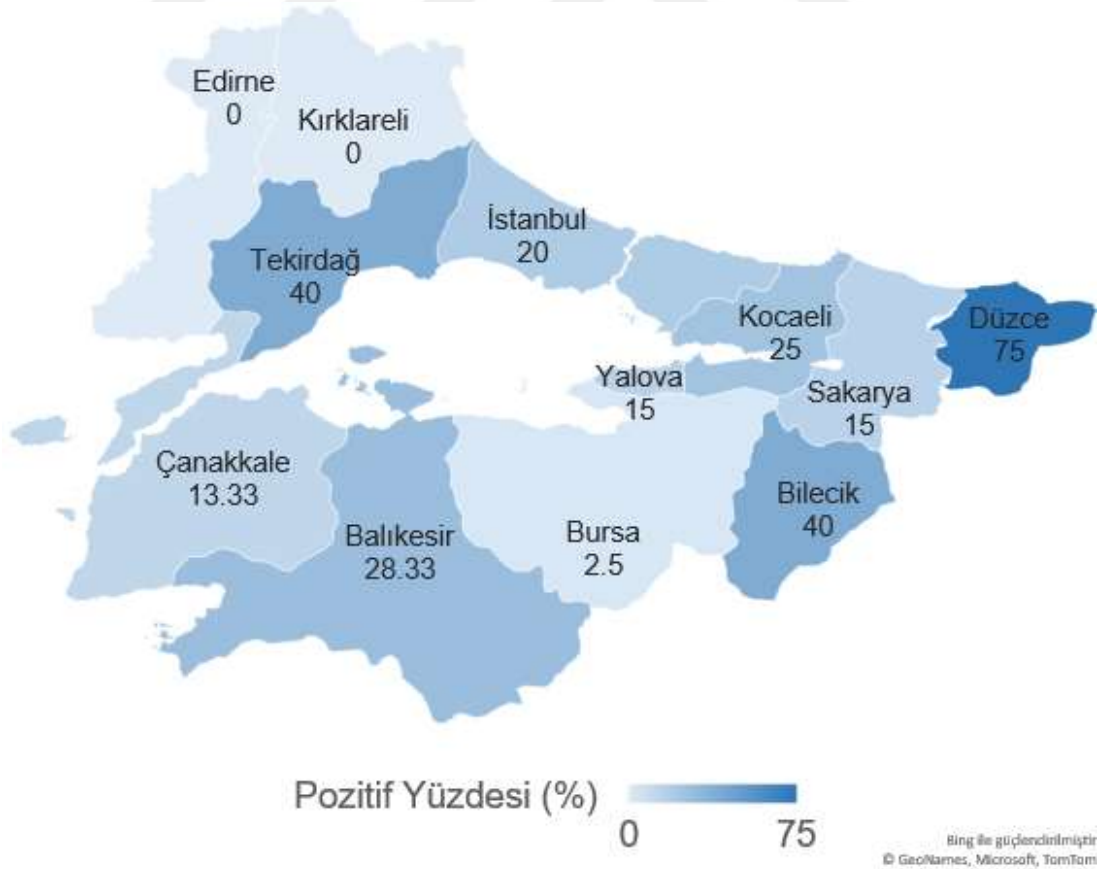


Şekil 3.1. ELISA test pleytlerinin görüntüsü

Araştırmada yer alan 12 ilin 10 ili seropozitif örnekler içerirken 2 ilin (Edirne ve Kırklareli) bütün örnekleri seronegatif tespit edildi (Şekil 3.2). SRLV enfeksiyonu tespit edilen iller %2.5 ile %75 oranında değişen seropozitif sonuçlar gösterdi. İller düzeyinde pozitiflik oranları harita grafiği ile Şekil 3.3’de gösterildi. Değişen oran değerleri renk skalası kullanılarak sınıflandırıldı.

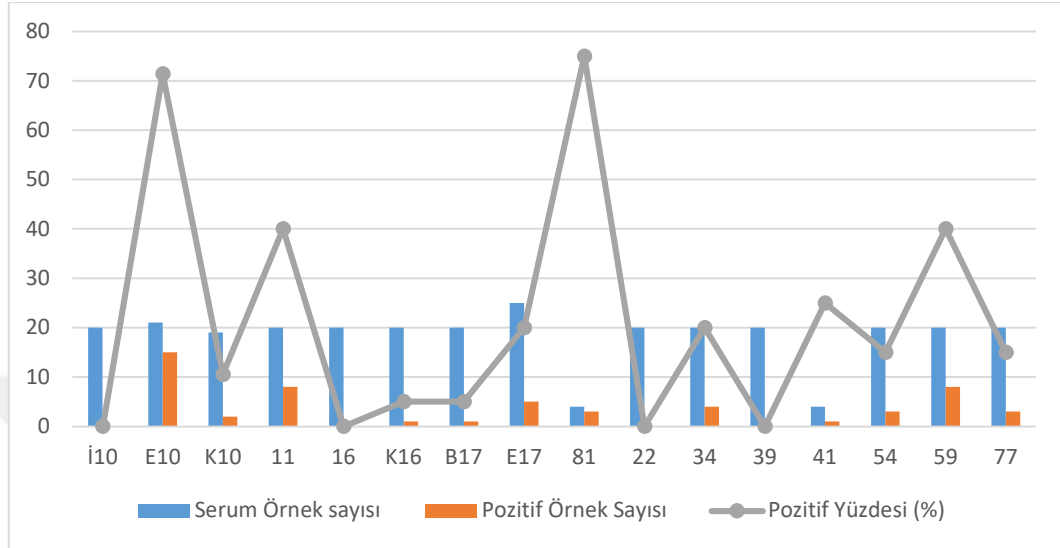


Şekil 3.2. İllerin serum örnek sayısı ve seropozitif tespit edilen örnek sayısı.



Şekil 3.3. İllerin seropozitif oran dağılımlarının görüntüsü

ELISA test sonuçları işletme düzeyinde incelendiğinde 16 adet işletmeden 12 adet işletme seropozitif sonuçlar içerirken 4 adet işletmeye ait bütün örnekler seronegatif tespit edildi. SRLV enfeksiyonu tespit edilen işletmelerde %5 ile %75 oranında değişen seropozitiflik belirlendi (Şekil 3.4).

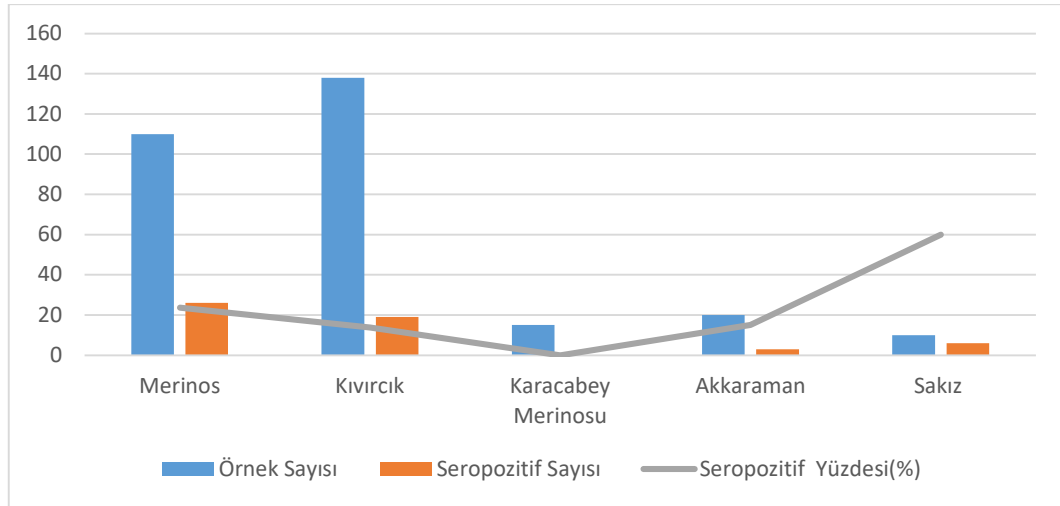


Şekil 3.4. İşletmelerin serum örnek sayısı, pozitif örnek sayısı ve seropozitif yüzdesi.

Araştırmada yer alan Merinos (n=110), Kıvırcık (n=138), Karacabey Merinosu (n=15), Akkaraman (n=20) ve Sakız (n=10) koyun ırklarının seropozitif örnek sayısı sırasıyla 26, 19, 0, 3 ve 6 olarak tespit edildi (Tablo 3.1). Koyun ırklarına göre sonuçların karşılaştırılması Şekil 3.5’de sütun grafiği ile gösterildi.

Tablo 3.1. Koyun ırklarının örnek sayısı, seropozitif sayısı ve seropozitif yüzdesi

İrk	Örnek Sayısı	Seropozitif Sayısı	Seropozitif Yüzdesi(%)
Merinos	110	26	23.64
Kıvırcık	138	19	13.77
Karacabey Merinosu	15	0	0
Akkaraman	20	3	15
Sakız	10	6	60



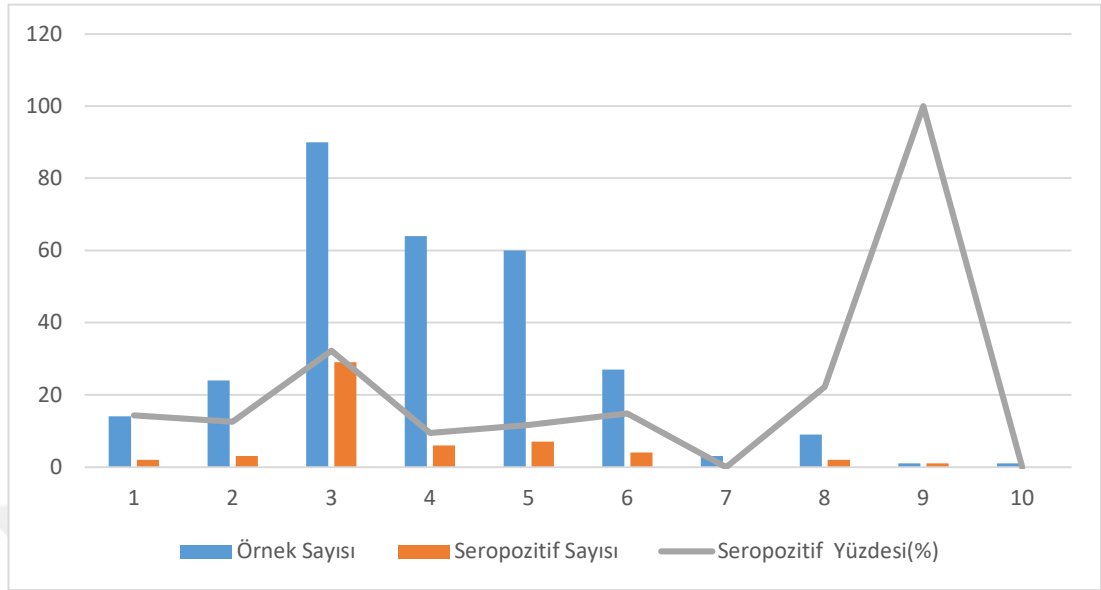
Şekil 3.5. Koyun ırklarına göre seropozitif belirlenen sonuçların gösterilmesi.

Örneklenen koyunlar 11 aydan 117 aya kadar değişen yaş aralığına sahipti. Koyunların yaş dağılımı, örnek sayısı, seropozitif sayısı ve yaş aralıklarının seropozitif yüzdeleri Tablo 3.2.'de gösterildi.

Tablo 3.2. Koyun yaş dağılımlarına göre örnek sayısı, seropozitif sayısı ve yüzdesi.

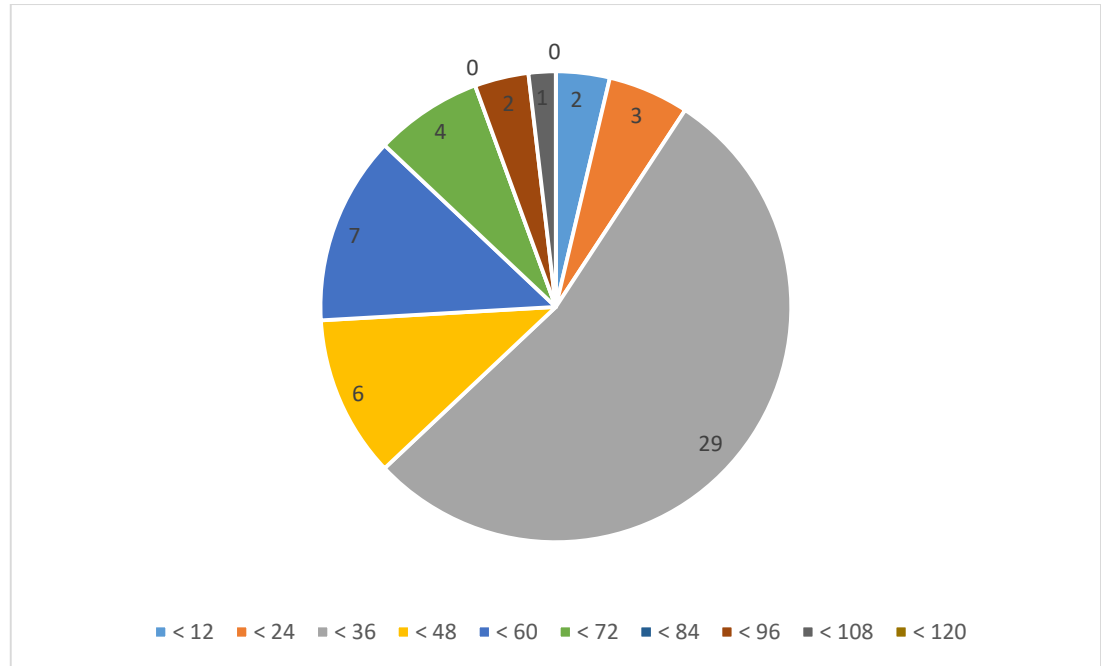
Grup	Yaş (Ay)	Örnek Sayısı	Seropozitif Sayısı	Seropozitif Yüzdesi(%)
1	< 12	14	2	14.29
2	< 24	24	3	12.5
3	< 36	90	29	32.22
4	< 48	64	6	9.38
5	< 60	60	7	11.67
6	< 72	27	4	14.81
7	< 84	3	0	0
8	< 96	9	2	22.22
9	< 108	1	1	100
10	< 120	1	0	0

Koyunların yaş dağılımı içerisindeki örnek sayısı, seropozitif sayısı ve seropozitif yüzdeleri Şekil 3.6’da karşılaştırılmalı olarak gösterildi.



Şekil 3.6. Seropozitif koyunların yaş dağılımı.

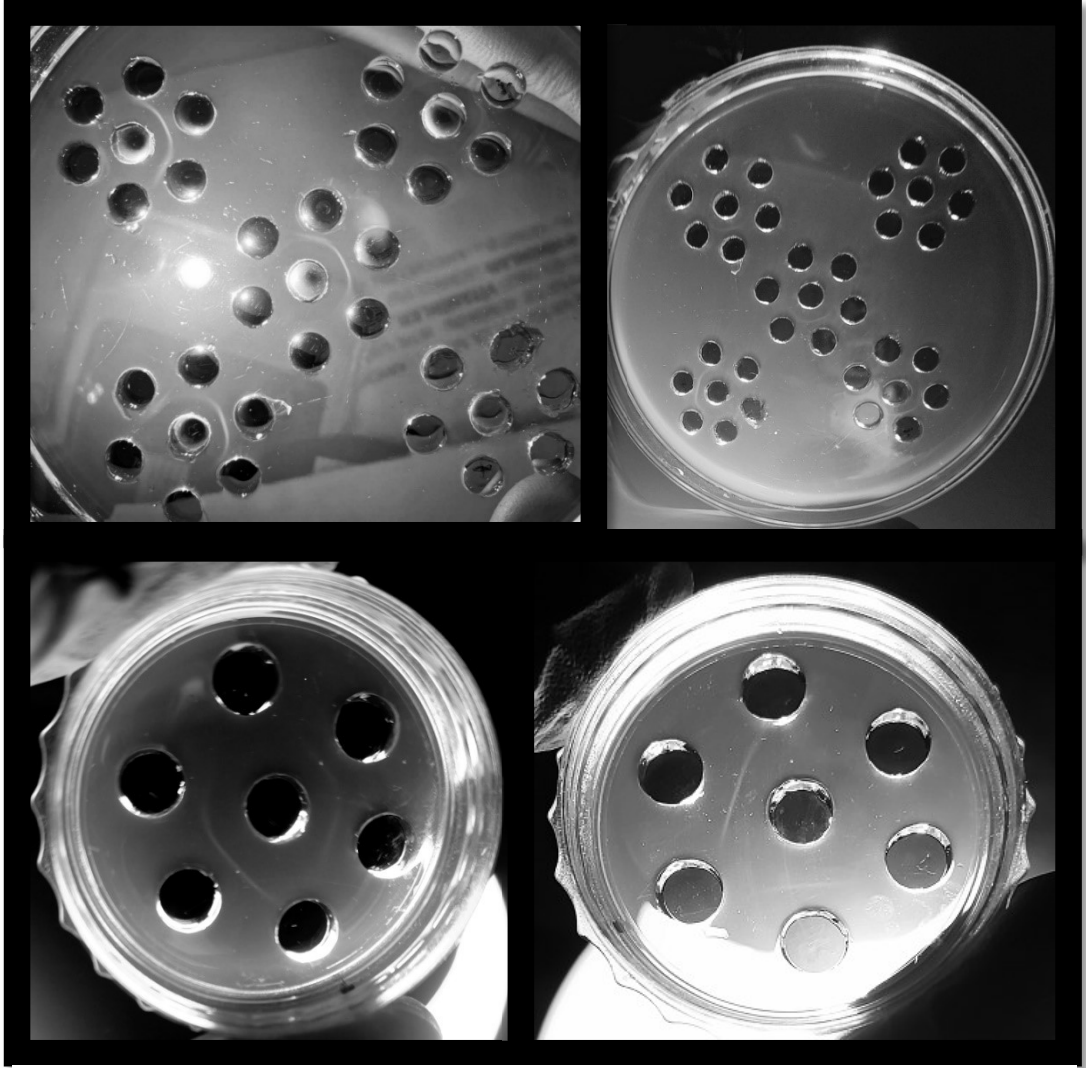
Örneklenen koyunlardan seropozitif tespit edilenlerin yaş dağılımı pasta grafiği ile Şekil 3.7’de gösterildi. Grafik içerisinde en geniş alan içerisinde 24 aydan büyük 60 aydan küçük yaş aralığında olanların yer aldığı görüldü.



Şekil 3.7. Seropozitif koyunların yaş dağılımı.

3.2. AGID Test Sonuçları

AGID testi için ELISA testi ile pozitif (n=54) ve negatif (n=47) bulunan toplam 100 adet örnek kullanıldı. Serolojik araştırmada yer alan ELISA testi ile seronegatif tanımlanan ve yüksek yaşa sahip 47 adet koyun örneği belirlendi. Test sonunda presipitin hatları kontrol edildi (Şekil 3.7). Sonuçlar 48 saat sonunda pozitif ve negatif kontroller dikkate alınarak değerlendirildi.



Şekil 3.7. AGID testinde tespit edilen presipitin çizgisinin görüntüsü.

AGID testi ile analiz edilen 100 adet örnekten 43 adet örnek pozitif 57 adet örnek negatif tespit edildi. Analiz edilen örneklere ilişkin AGID ve ELISA test sonuçları karşılaştırmalı olarak Tablo 3.3’de verildi.

Tablo 3.3. Karşılaştırmalı AGID ve ELISA test sonuçları

Örnek Numaraları	AGID / ELISA	Örnek Numaraları	AGID / ELISA	Örnek Numaraları	AGID / ELISA	Örnek Numaraları	AGID / ELISA
E 1004	-/+	1114	-/+	K 5919	-/+	K 1619	-/-
E 1003	-/+	1117	+/+	K 5904	+/+	K 1012	-/-
E 1002	-/+	1119	+/+	K 1603	-/-	K 1017	-/-
E 1005	+/+	3409	+/+	1120	-/-	K 1018	-/-
E 1006	-/+	3410	-/+	E 1701	-/-	B 1705	-/-
E 1007	+/+	3411	+/+	1105	-/-	B 1713	-/-
E 1008	+/+	3413	+/+	E 1723	-/-	B 1714	-/-
E 1009	+/+	4101	+/+	K 1615	-/-	7701	-/-
E 1010	+/+	7704	+/+	K 5906	+/+	7706	-/-
E 1012	+/+	7710	-/+	K 5909	+/+	7708	-/-
E 1013	+/+	7713	+/+	K 1007	-/-	7715	-/-
E 1015	+/+	8102	+/+	7714	-/-	7716	-/-
E 1016	+/+	8103	+/+	K 1013	-/-	E 1708	-/-
E 1019	-/+	8104	+/+	K 1014	-/-	E 1716	-/-
5403	-/+	B 1709	+/+	7705	-/-	E 1717	-/-
5412	+/+	E 1706	+/+	7711	-/-	E 1719	-/-
5420	+/+	E 1712	+/+	7717	-/-	E 1722	-/-
K 1002	-/+	E 1715	+/+	K 1006	-/-	K 1001	-/-
K 1008	+/+	E 1721	+/+	7702	-/-	K 1004	-/-
E 1021	+/+	E 1724	+/+	7703	-/-	K 1005	-/-
1101	+/+	K 1616	+/+	7707	-/-	K 1009	-/-
1104	+/+	K 5911	+/+	7709	-/-	3403	-/-
1108	+/+	K 5912	+/+	7712	-/-	K 1015	-/-
1112	+/+	K 5913	+/+	K 1604	-/-	1110	-/-
1113	+/+	K 5914	+/+	K 1608	-/-	B 1701	-/-

3.3. Serolojik Yöntemlerin Karşılaştırılması

AGID testi ile pozitif tespit edilen 43 adet örneğin tamamı ELISA testinde de pozitif tespit edildi. AGID testi ile negatif bulunan 57 adet örneğin ise 11 adeti ELISA testinde pozitif tespit edildi. Örneklerden 46 tanesi her iki testte de negatif belirlendi. Tablo 3.4’de karşılaştırmalı sonuçlar gösterildi.

Tablo 3.4. AGID ve ELISA testinin pozitif (+) ve negatif (-) sayılarının karşılaştırılması.

	AGID +	AGID –	Toplam
ELISA +	43	11	54
ELISA –	0	46	46
Toplam	43	57	100

AGID ve ELISA testi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacı ile kappa testi kullanıldı. Kappa, 0 (uyum yok) ile 1 (mükemmel uyum) arasında değişmektedir. Analiz edilen örnekler düzeyinde AGID ve ELISA testinin kappa değeri 0.7824 olarak hesaplandı. Güven sınırı (%95) içerisinde 0.6641 ile 0.9008 alt ve üst değerlere sahip bulundu (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. AGID ve ELISA testinin Kappa sonuçları.

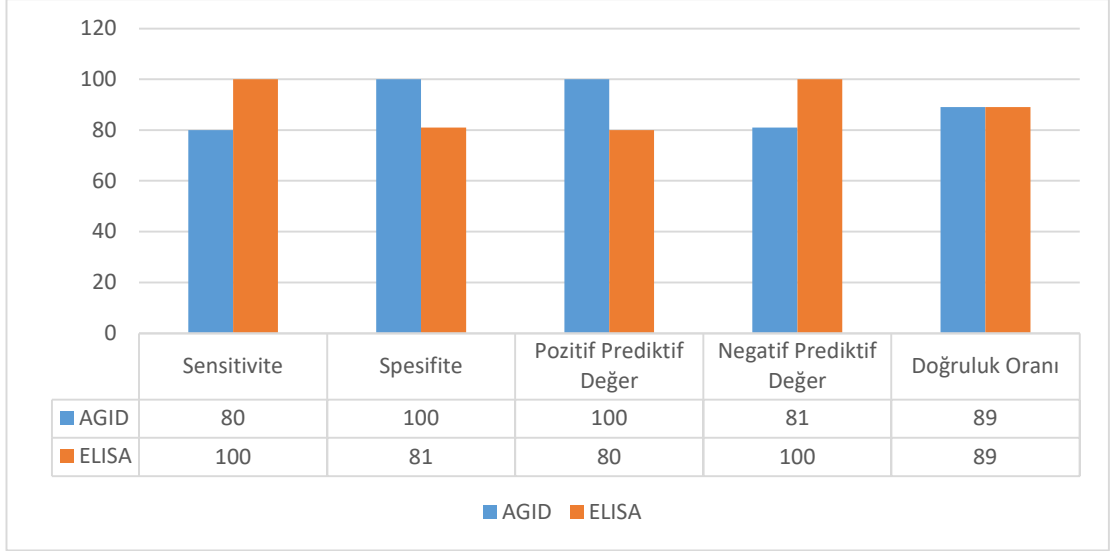
Test Karşılaştırma İstatistikleri	Değer
Kappa	0.7824
%95 Olasılıkla Kappa Alt Güven Sınırı	0.6641
%95 Olasılıkla Kappa Üst Güven Sınırı	0.9008

AGID ve ELISA testlerinin teşhis performanslarını değerlendirmek için sensitivite, spesifite, doğruluk oranı, PPD ve NPD parametreleri kullanıldı. ELISA testi referans test olarak kabul edildiğinde AGID testi sırasıyla 80, 100, 89, 100 ve 81 değerlerine sahip bulundu. AGID testi referans kabul edildiğinde ise ELISA testi 100, 81, 89, 80 ve 100 değerlerine sahip bulundu (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. AGID ve ELISA testlerinin sensitivite, spesifite, PPD, NPD ve Doğruluk Oranı değerleri.

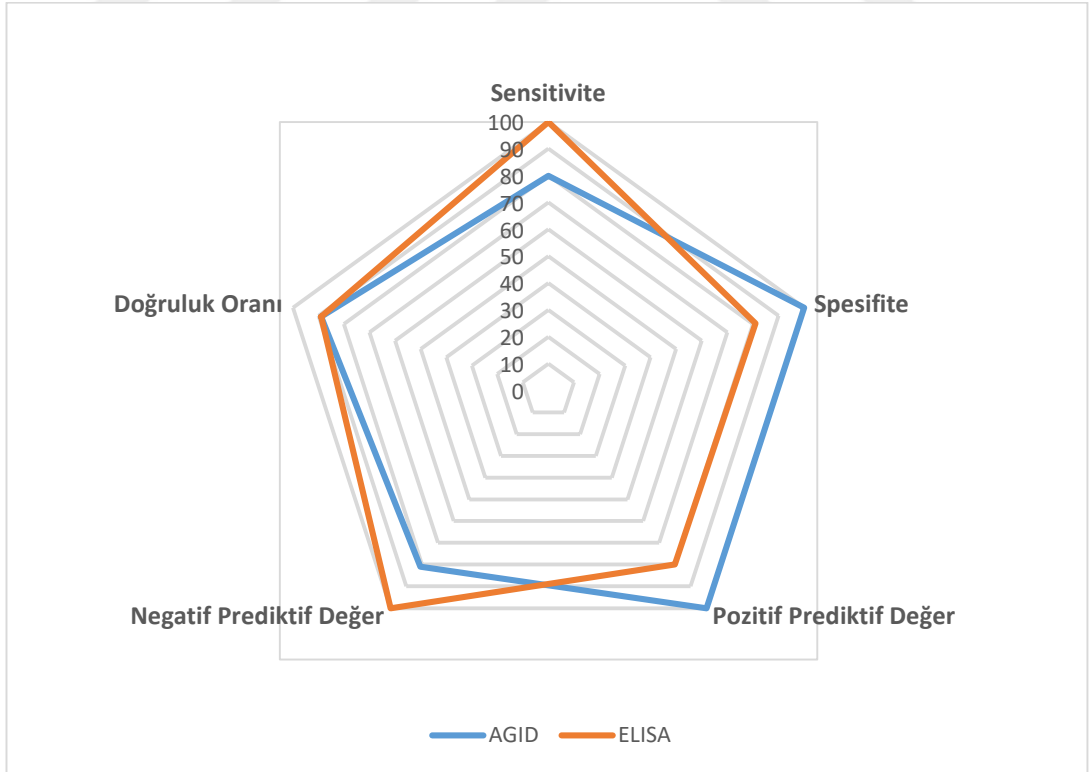
AGID Sonuçları				ELISA Sonuçları			
		+	-			+	-
ELISA Sonuçları	+	43 (DP)	11 (YP)	AGID Sonuçları	+	43 (DP)	0 (YP)
	-	0 (YN)	46 (DN)		-	11 (YN)	46 (DN)
Sensitivite (%)	$\frac{43}{43 \pm 0} \times 100 = \mathbf{100}$			Sensitivite (%)	$\frac{43}{43 \pm 11} \times 100 \cong \mathbf{80}$		
Spesifite (%)	$\frac{46}{11 \pm 46} \times 100 \cong \mathbf{81}$			Spesifite (%)	$\frac{46}{46 + 0} \times 100 = \mathbf{100}$		
PPD (%)	$\frac{43}{43 + 11} \times 100 \cong \mathbf{80}$			PPD (%)	$\frac{43}{43 + 0} \times 100 = \mathbf{100}$		
NPD (%)	$\frac{46}{46 + 0} \times 100 = \mathbf{100}$			NPD (%)	$\frac{46}{46 + 11} \times 100 \cong \mathbf{81}$		
Doğruluk Oranı (%)	$\frac{43 + 46}{43 + 11 + 0 + 46} \times 100 = \mathbf{89}$			Doğruluk Oranı (%)	$\frac{43 + 46}{43 + 0 + 11 + 46} \times 100 = \mathbf{89}$		

Teşhis performans parametrelerinin sonuçları sütun grafiği Şekil 3.8’de AGID ve ELISA testleri için gösterildi. AGID testinin spesifite ve PPD değeri ELISA testinden daha yüksek bulundu. ELISA testinin ise sensitivite ve NPD değerleri daha yüksek bulundu.



Şekil 3.8. AGID ve ELISA testlerinin sensitivite, spesifite, PPD, NPD ve Doğruluk Oranı parametrelerinin sonuçları.

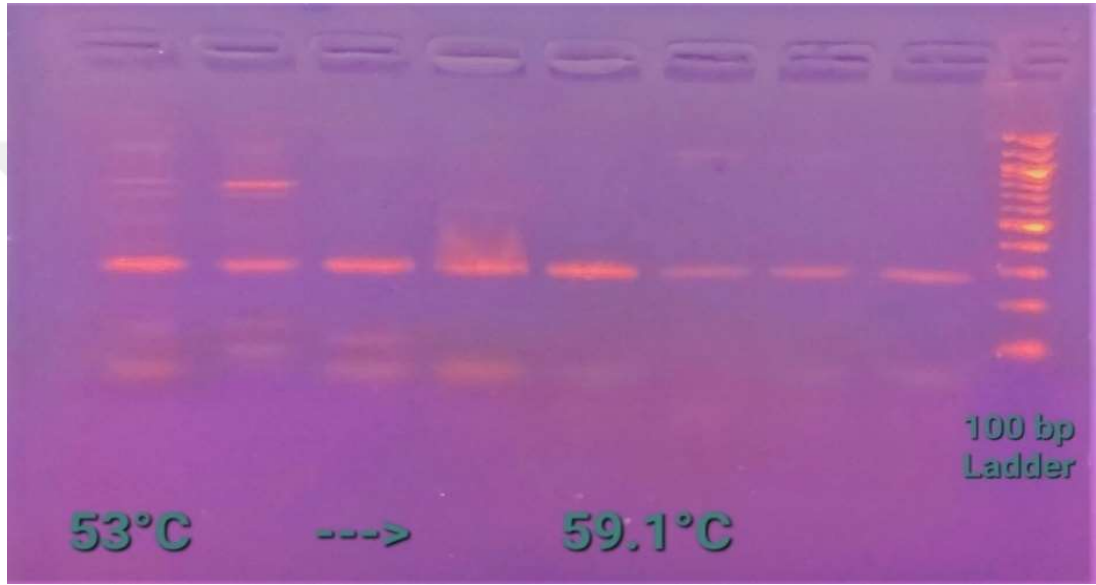
AGID ve ELISA testlerinin teşhis performans parametre değerlerinin karşılaştırması radar grafiği ile Şekil 3.9’de gösterildi. AGID testinin spesifite ve PPD değeri ile ELISA testinin sensitivite ve NPD değerleri arasında farklılık göstermektedir. Doğruluk oranı her iki test için aynı değere sahiptir.



Şekil 3.9. AGID ve ELISA testlerinin sensitivite, spesifite, PPD, NPD ve Doğruluk Oranı parametrelerin radar grafiği.

3.4. PCR Optimizasyon Sonuçları

LTR2a primerinin T_m değeri yaklaşık olarak 55.7°C hesaplandı. Bu değerden -2°C baz alınarak 53°C ve 63°C arası gradient PCR analizi için ısı değerleri PCR Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, ABD) cihazından alındı. Cihaz kuyucuklarına sırasıyla 63°C , 62.2°C , 61°C , 59.1°C , 56.8°C , 54.9°C , 53.7°C ve 53°C değerlerinde ısı derecesi verdi. Bu belirtilen ısı derecelerinde TR-Yalova-2016 (MN186564) izolatu gradient PCR analizine alındı. Analiz sonrası agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel görüntüsü Şekil 3.10'da sunuldu.



Şekil 3.10. Gradient PCR sonuçları.

Jel görüntüsünde 53°C , 53.7°C , 54.9°C , ve 56.8°C ısı değerlerinde 291 bp civarından güçlü bantlar elde edildi. Ancak bu ısı derecelerinde atipik bant oluşumları görüldü. Tek bant görüntüsü 59.1°C ısı derecesinden elde edildi. Bu nedenle annealing ısı derecesi 59°C olarak belirlendi.

Tespit limitinin belirlenmesi için TR-Yalova-2016 (MN186564) izolatından elde edilen nükleik asitin 10 katlı dilüsyonu yapıldı. Belirlenen annealing ısı derecesi ile dilüsyonların PCR analizi yapıldı. Analiz sonrası agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel görüntüsü Şekil 3.11’de sunuldu.



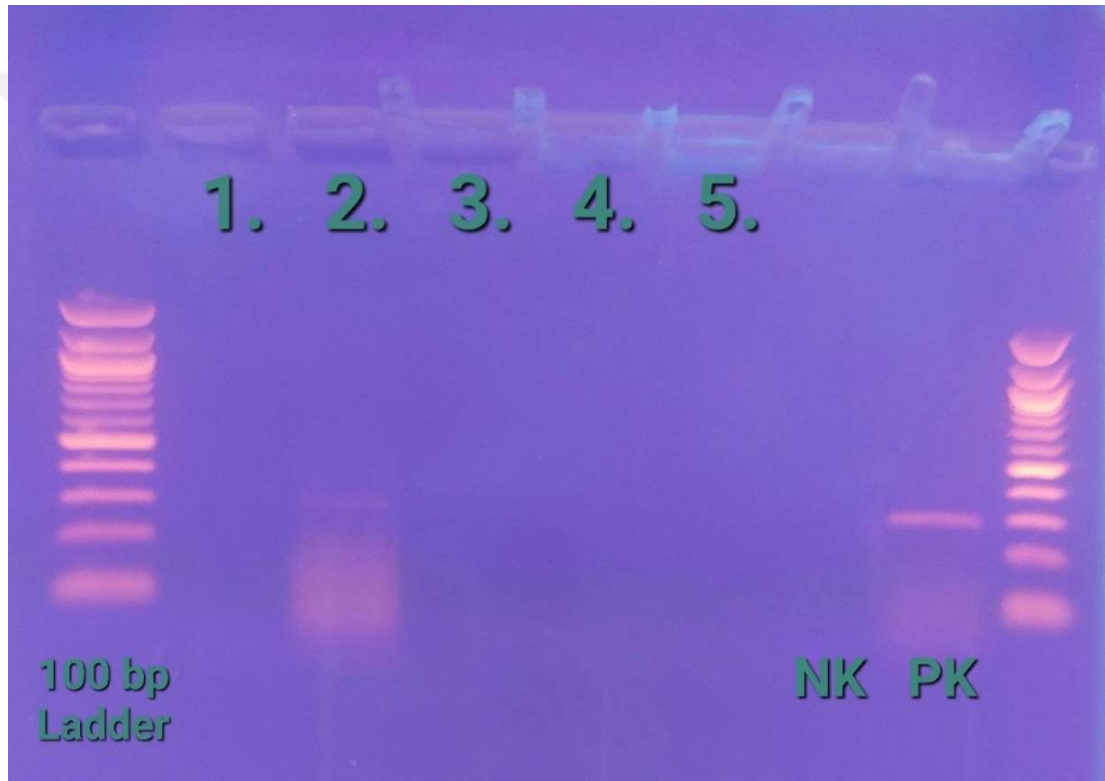
Şekil 3.11. Tespit limitinin jel görüntüsü.

Agaroz jel elektroforezinde nükleik asitin 1/10 (-1), 1/100 (-2) ve 1/1000 (-3) sulandırma oranlarında ampikon varlığı gözlemlendi.

3.5. PCR Analiz Sonuçları

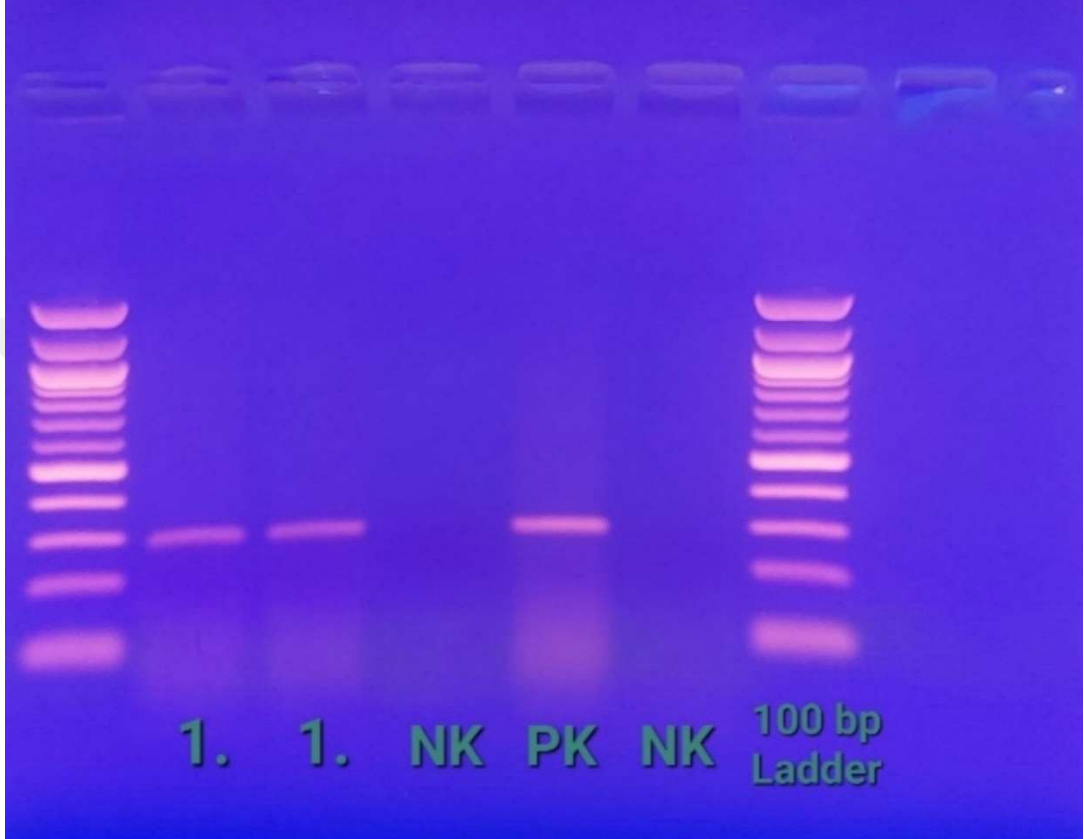
PCR optimizasyonu ile elde edilen protokolle PCR analizi gerçekleştirildi. Hastalık şüphesi ile farklı tarihlerde 6 adet işletmeden gönderilen toplam 15 adet örnekte viral DNA varlığı araştırıldı. Düzce ve Bilecik illerinden elde edilen örneklerden pozitif sonuçlar alındı.

Düzce'den elde edilen 5 adet defibrine kan örneği ve 1 adet negatif ile 1 adet pozitif kontrol analize alındı. Örnekler içerisinde 1 adeti ile pozitif kontrol agaroz jel elektroforezinde 291 bp büyüklüğünde bant oluşumu görüldü. Diğer 4 adet örnek ile negatif kontrolde bant oluşumu görülmedi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Düzce'den alınan örneklerin PCR analiz sonucu. (Örnekler 1-5 arasında sıralandı, 2. örnekte bant görüldü. Bir Negatif kontrol (NK) ve bir pozitif kontrol (PK) kullanıldı.

Bilecik'den alınan akciğer örneği 2 tekrarlı olarak 2 adet negatif kontrol ve 1 adet pozitif kontrol ile analize alındı. Agaroz jel elektroforezinde örnek içeren kuyucuklar ile pozitif kontrolü içeren kuyucukta 291 bp büyüklüğünde bant oluşumu gözlemlendi. Negatif kontrol içeren 2 kuyucukta bant oluşumu gözlenmedi (Şekil 3.13).

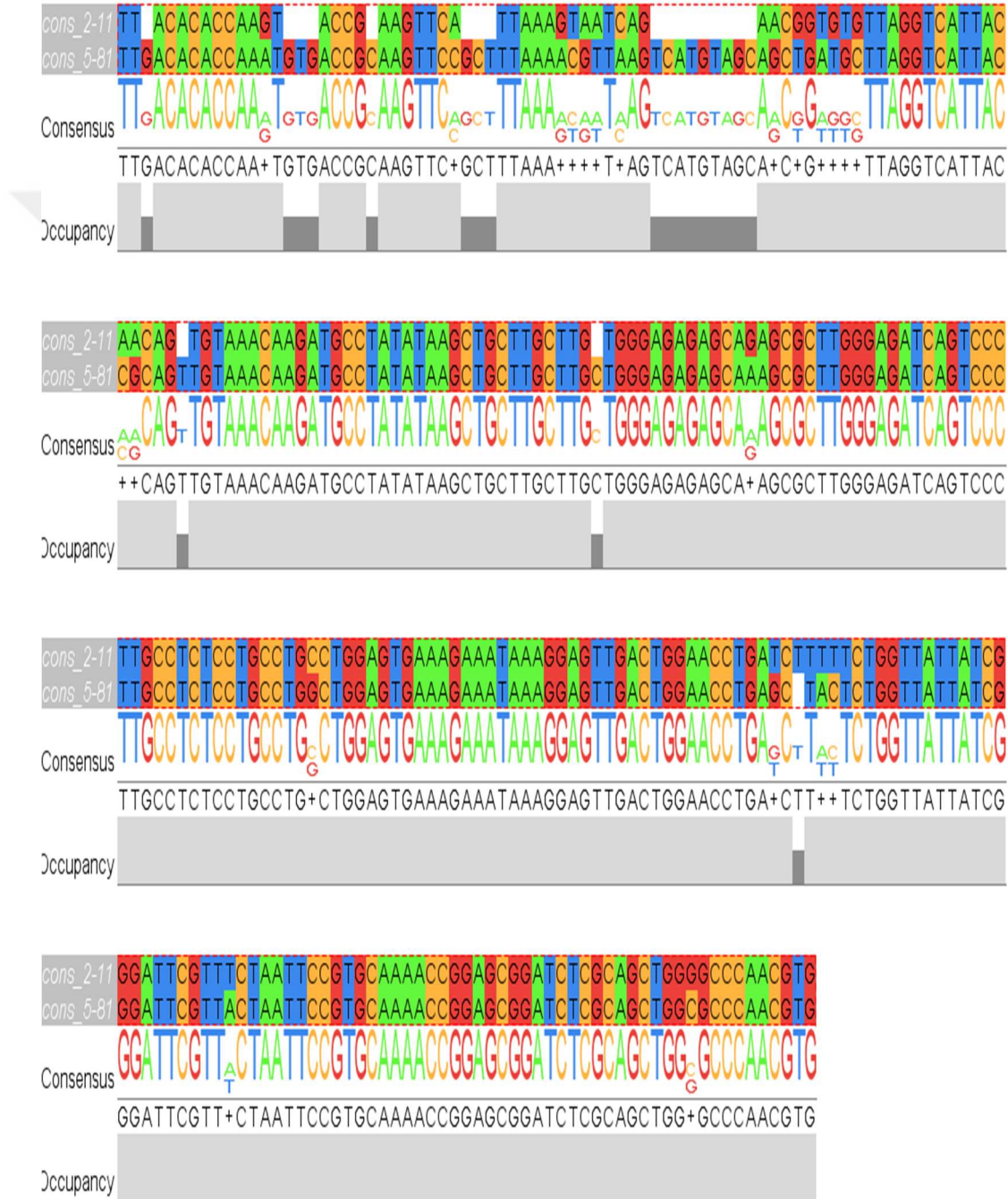


Şekil 3.13. Bilecik'den alınan örneğin PCR analiz sonucu. (Aynı örnek kuyucuklara yan yana konuldu. Örnekte her iki kuyucukta aynı bant görüldü. İki adet negatif kontrol (NK) ve bir adet pozitif kontrol (PK) kullanıldı.

Pozitif tespit edilen örneklerle ait ampliconlar Yang ve ark (2013) tarafından bildirilen metot ile saflaştırma işlemi uygulandı. Saflaştırma işleminin ardından ampliconlar DNA dizilimine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.6. LTR Gen Bölgesinin Dizin Analiz Sonuçları

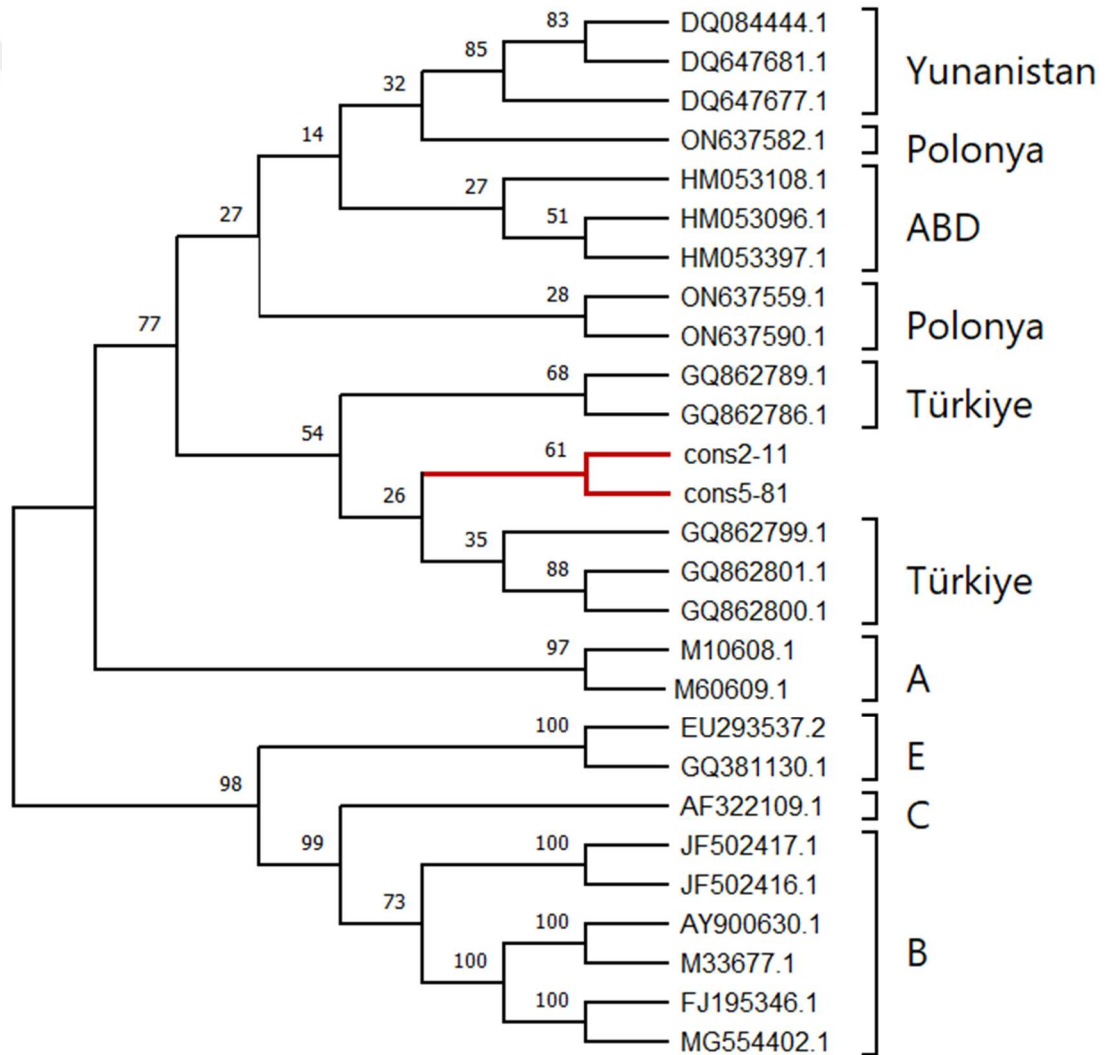
Pozitif tespit edilen örneklerle ait amplikonların dizin analizleri Sanger metot ile gerçekleştirildi. Dizinlerin kromatogramları değerlendirildi. Forward ve revers yönlerinden elde edilen dizinlerin hizalanması yapıldı. Elde edilen dizinler cons 2-11 ve cons 5-81 izolatları olarak adlandırıldı. İzolatlara ait dizinler Şekil 3.14’de gösterildi.



Şekil 3.14. Sekans analizi sonucunda elde edilen dizinler.

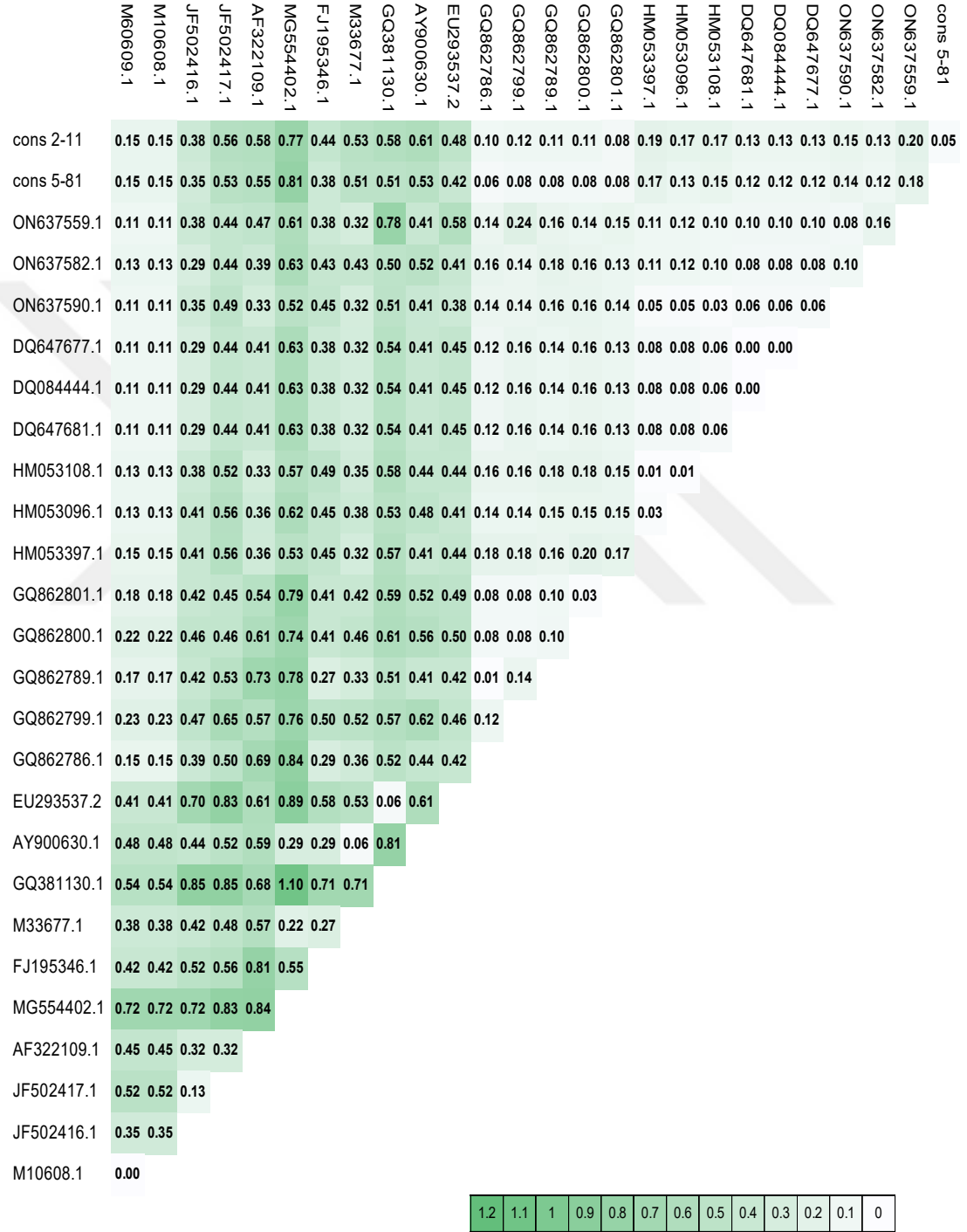
3.7. Filogenetik Analiz Sonuçları

Bu çalışmada elde edilen yerel viruslar ile referans dizinler ve farklı ülkelere ait izolatların dizinleri Maximum Likelihood metodu ile Kimura 2 parametrelili model seçilerek filogenetik ağaç için metot ve model oluşturuldu. Beş oran kategorisine sahip gama dağılımı (+G) ve 1000 bootstrap uygulanarak analiz gerçekleştirildi. Analiz ile elde edilen filogenetik ağaç sonucunda yerel virusların Genotip A içerisinde yer aldığı görüldü. Genotip A ile karakterize olan yerel virusların Türkiye’de daha önce tespit edilen izolatlar ile kümelendiği gözlemlendi. Filogenetik ağaç Şekil 3.15’de sunuldu.



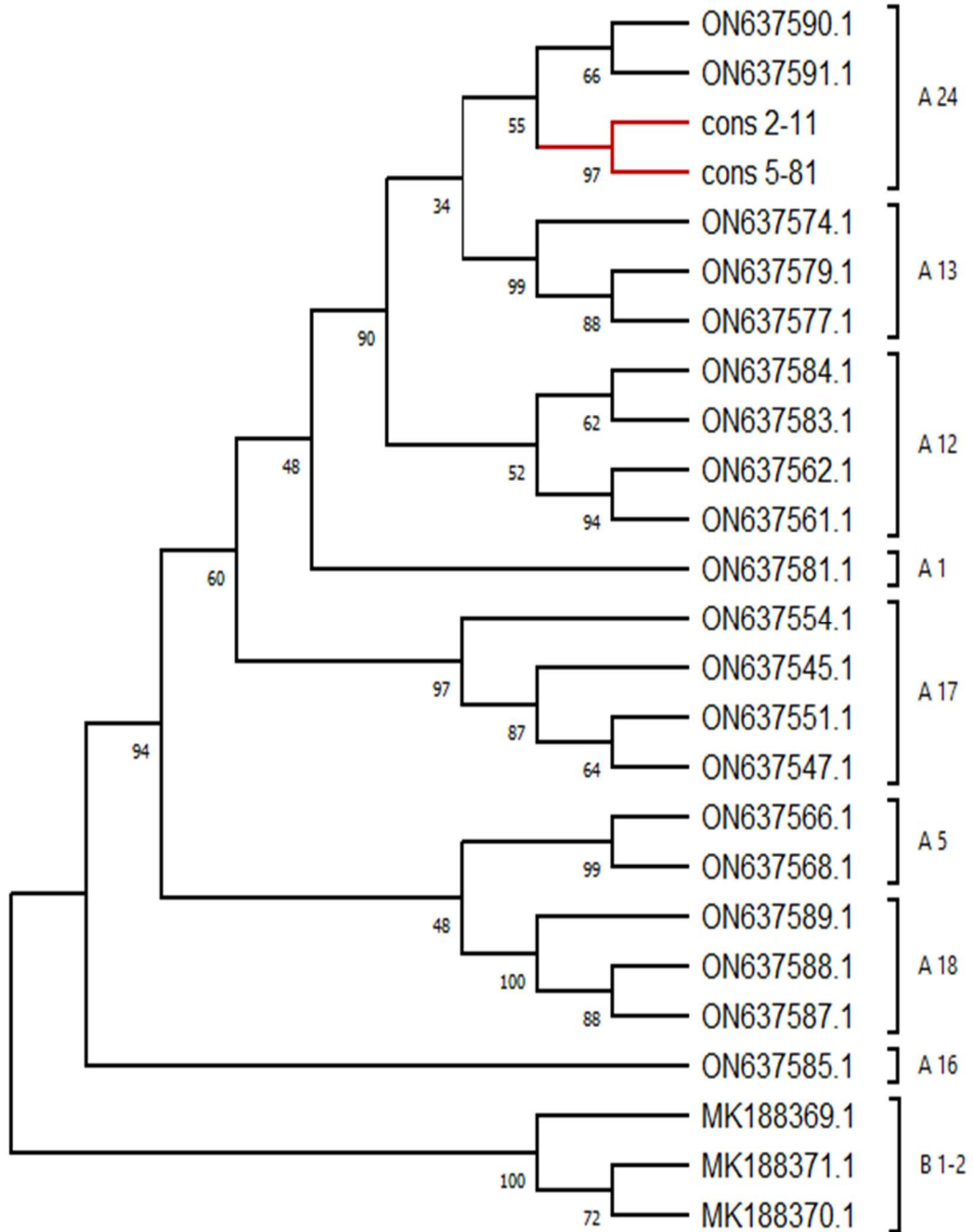
Şekil 3.15. Referans dizinler ve farklı ülkelere ait izolat dizinleri ile oluşturulan filogenetik ağaç. Yerel viruslar koyu kırmızı dal ile gösterildi.

Referans dizinler ve farklı ülkelere ait izolatların dizinleri ile genetik uzaklık analizi gerçekleştirildi. Analizde yerel virusların Genotip B, Genotip C ve Genotip E ile oluşan yüzde oranda farklılık Genotip A ile oluşan yüzde oranda farklılıktan fazla olduğu görüldü. Ülke izolatları içerisinde ise %6 ila %20 oranında değişen uzaklıkta olduğu belirlendi (Şekil 3.16).



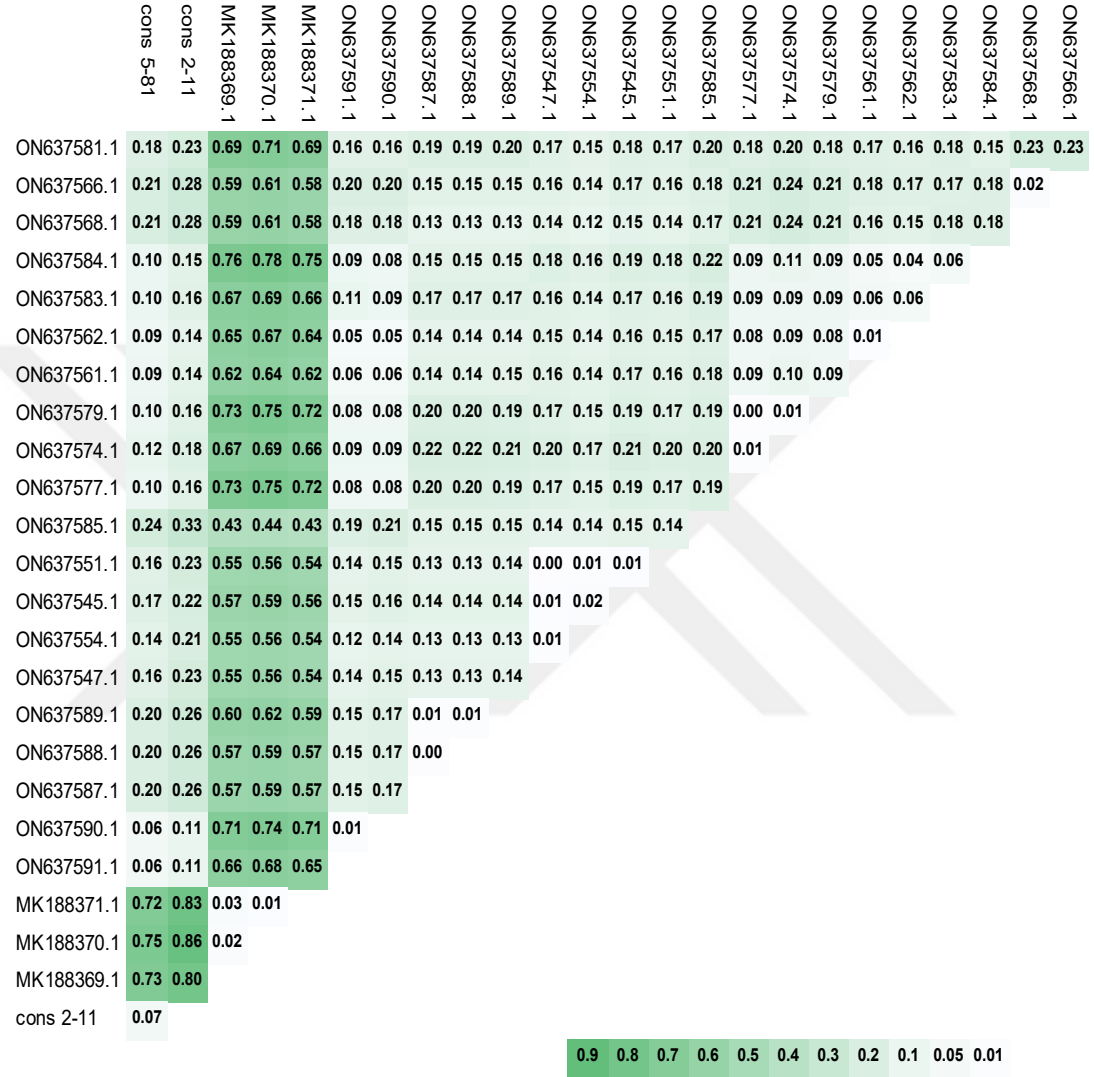
Şekil 3.16. Referans dizinler ve farklı ülkelere ait izolatların dizinleri ile genetik uzaklık analizi sonuçları.

Genotip A ile karakterize olan yerel virusların alt tipi belirlenmesinde Mendiola ve ark (2019) ile Olech ve ark (2022) tarafından yapılan sınıflandırmadan yararlanıldı. Genotip A ve Genotip B ile karakterize edilmiş olan farklı alt tip izolatlar ile yerel viruslar filogenetik analize alındı. Bu çalışmada yer alan iki virus izolatının da A24 alt tipi ile kümelendiği görüldü (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Alt tip izolat dizinleri ile oluşturulan filogenetik ağaç. Yerel viruslar koyu kırmızı dal ile gösterildi.

Farklı alt tipler ile yerel virusların genetik uzaklık analizinde Genotip B içerisinde yer alan alt tip izolatlarının dizinleri ile %72-%86 oranlarla farklılık gösterdiği görüldü. Genotip A içerisinde yer alan alt tip izolatlarının dizinleri ile ise %6 ila %33 oranında değişen farklılığa sahip olduğu belirlendi (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Alt tip izolat dizinleri ile genetik uzaklık analizi sonuçları.

Filogenetik analizler için bu çalışmada tanımlanan yerel virus dizileri ile SRLV referans dizileri ve ülke izolat dizinleri kullanıldı. Metot olarak Mendiola ve ark (2019) ile Olech ve ark (2022) tarafından kullanılan yöntemden yararlanıldı. Analiz ile elde edilen filogetik ağaç ve genetik uzaklık analizinde Genotip B, Genotip C ve Genotip E dizinleri ile yerel virus dizinlerinin uzaklığı gösterildi. Çalışmada tespit edilen yerel virus dizilerinin Genotip A ile ilişkili olduğu tespit edildi.

4. TARTIŞMA

Dünya çapında koyun yetiştiriciliği yöntemleri birçok çeşitliliğe sahiptir. Koyun yetiştiriciliği ekolojik farklılıklar ve sosyoekonomik şartlar yelpazesinde çok çeşitli ürünler sunmaktadır. Türkiye’de koyun yetiştiriciliği yün, et ve süt üretimi amacı ile yapılmaktadır (Morris 2017). Küresel koyun popülasyonunun dağılımı içerisinde yoğun olan alanlar arasında Marmara Bölgesi’ndeki iller yer almaktadır (Gilbert ve ark 2010). Koyun yetiştiriciliği için önemli ekonomik etkisi olan SRLV enfeksiyonlarının yetiştiriciler tarafından büyük ölçüde dikkate alınmadığı belirtilmektedir (Gibson ve ark 2018). Enfeksiyon persiste karaktere sahiptir. Ayrıca uzun bir inkübasyon periyodunun ardından neden olduğu Maedi-Visna hastalığının bilinen ve önerilen spesifik bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Koyun sürüleri için enfeksiyona yönelik koruyucu etkin bir aşı da henüz yoktur. Bu sebeple koyun sürülerinin SRLV enfeksiyonundan korunmasına yönelik kontrol programlarına gereksinim duyulmaktadır (Ramírez ve ark 2013). SRLV etkeninin gösterdiği yüksek genetik değişimler antijen yapısında çeşitliliğe ve yeni suşların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Colitti ve ark 2019). Bu durum çeşitli teşhis metotlarının enfeksiyonun teşhisinde kullanımını olumsuz yönde etkilemektedir (Aalberts ve ark 2021). Günümüzde birkaç istisnai dışında birçok ülkede SRLV enfeksiyonunun varlığı bildirilmiş olup; ülkeler içerisinde yer alan farklı bölgeler arasında prevalans oranlarının heterojen dağılım sergilediği görülmektedir (Zhang ve ark 2013, Alves ve ark 2017, Savic ve ark 2020). SRLV enfeksiyonunun yaygınlığı, etkenin genetik değişkenliği, konakçı bariyerini aşması, teşhisindeki olumsuzluklar, persiste enfeksiyon özelliği, kontrol programlarındaki zorluklar ve ekonomik etkileri nedeni ile araştırmalarda güncelliğini korumaktadır.

Koyun yetiştiriciliği yapılan Avustralya, Yeni Zelanda ve İzlanda ülkeleri dışında SRLV enfeksiyonları yaygın olarak görülmektedir. Dünyada enfeksiyonun yaygınlığı yönünden yapılan çalışmalar farklı sonuçlar içermektedir. Avrupa kıtasında yapılan çalışmalarda SRLV prevalans değerleri Avusturya’da Hönger ve ark (1990) tarafından %9.5, Belçika’da Michiels ve ark (2018) tarafından %9, Çekya’da Barták ve ark (2018) tarafından %19.9, Finlandiya’da Sihvonen ve ark tarafından (2000) %0, Almanya’da, Huttner ve ark (2010) tarafından %28.8, Yunanistan’da Karanikolaou ve ark (2005) tarafından %65, İtalya’da Tumino ve ark (2022) tarafından %26, Kosova’da Cana ve ark (2020) tarafından %34.84, Polonya’da Junkuszew ve ark (2016)

tarafından %11.3, Sırbistan'da Vidić ve ark (2008) tarafından %16.24, İspanya'da Echeverría ve ark (2020) tarafından %19, İsviçre Schaller ve ark (2020) tarafından %9 ve Birleşik Krallık'ta Ritchie ve ark (2010) tarafından %0.74 olarak bildirilmiştir.

Asya kıtasında yer alan ülkelerde yapılan çalışmalarda SRLV prevalans oranları Çin'de Zhang ve ark (2013) tarafından %22.77, Hindistan'da Didugu ve ark (2016) tarafından %2.28, Irak'ta Mosa ve ark (2020) tarafından %12.85, İran'da Norouzi ve ark (2015) tarafından %34.5, Japonya'da Giangaspero ve ark (2011) tarafından %1.12, Ürdün'de Tolari ve ark (2013) tarafından %36.4, Pakistan'da Mahmood ve ark (2012) tarafından %7.52 ve Suriye'de Giangaspero ve ark (1993) tarafından %6 olarak bildirilmiştir.

Afrika kıtasında yer alan ülkelerde yapılan çalışmalarda SRLV prevalans oranları Etiyopya'da Ayelet ve ark (2001) tarafından %3.7, Fas'ta Bouljihad ve ark (1994) tarafından %24.8 ve Nijerya'da Belino ve Ezeifeke (1984) tarafından %4.6 olarak bildirilmiştir.

Kuzey Amerika kıtasında yer alan ülkelerde yapılan çalışmalarda SRLV prevalans oranları Kanada'da Fournier ve ark (2006) tarafından %13.0, Meksika'da Mendiola ve ark (2019) tarafından %10.55, ABD'de Gerstner ve ark (2015) tarafından %18 olarak bildirilmiştir.

Güney Amerika kıtasında yer alan ülkelerde yapılan çalışmalarda SRLV prevalans oranları Brezilya'da Vinha ve ark (2020) tarafından %8,2, Arjantin'de Trezeguet ve ark (2013) tarafından %2,49 olarak bildirilmiştir.

Türkiye'de SRLV enfeksiyonları 1975 yılında histopatolojik inceleme ile Maedi-Visna hastalığı olarak ifade edilmiştir (Alibaşoğlu ve Arda 1975). Girgin ve ark (1987) tarafından solunum sistemi belirtileri ve ölüm görülen ithal koçlardan serolojik olarak tanımlanmıştır. SRLV enfeksiyonları yaygınlığına araştırılmasına yönelik Türkiye'de devam eden süreçte birçok çalışma gerçekleştirilmiştir.

Türkiye'de Burgu ve ark (1990) tarafından farklı bölgelerden 12 tane işletmeden elde edilen 1099 adet koyun serum örneğinden 263 adeti seropozitif tanımlanmış, %23,9 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Konya ilinde 9 tane işletmeden Yavru ve ark (2002) tarafından 1343 adet serumu örneğinden 39 adeti seropozitiflik tanımlanmış, %2,9 oranında seroprevalans tespit edilmiştir. Farklı illerde bulunan kamuya ait 10 tane işletmeden Tan ve Alkan (2002) tarafından

örneklenen 628 adet koyundan 168 adeti seropozitif tanımlanmış, %26.7 oranında seroprevalans tespit edildiği bildirilmiştir. Karaoğlu ve ark (2003) 8 tane koyun işletmesinden aldıkları 825 adet koyun serum örneklerinden 22 adeti seropozitif tanımlanmış, %2,6 oranında seroprevalans rapor etmişlerdir. Şanlıurfa ili merkez ve çevre köylerinden elde edilen 300 adet koyun serum örneklerinden Çimtay ve ark (2004) tarafından %10 oranında seroprevalans bildirilmiştir. İstanbul ilinde Preziuso ve ark (2010) tarafından epidemiyolojik bir ön çalışmada 542 adet koyun serum örneklerinden enfeksiyonun seroprevalansı %15.3 olarak bildirilmiştir. Şanlıurfa ilinde Ün ve ark (2018) tarafından yapılan başka bir araştırmada %5,29 oranında seroprevalans tespit edilmiştir. Van ilinde Akkan ve ark (2009) tarafından 465 adet serum örneğinden 30 adeti seropozitif tanımlanmış, %6,45 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Van, Ağrı ve Hakkâri illerinden Ameen ve Karapınar (2018) tarafından incelenen 360 adet serumu örneğinden 38 adeti seropozitif olarak tanımlanmış, %10.5 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Kırıkkale ilinden Azkur ve ark (2011) tarafından 279 adet serum örneğinden 54 adet örnek seropozitif tanımlanmış, %19.4 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Karadeniz Bölgesi'nde Albayrak ve ark (2012) tarafından 583 adet koyun serum örneğinden 137 adeti seropozitif tanımlanmış, %23,5 oranından seroprevalans bildirilmiştir. Farklı illerden Muz ve ark (2013) 13 tanesi respiratorik hastalıklar bulunan toplamda 23 tane işletmeden elde edilen 911 koyun serum ve kan örneklerinden 618 örnekte enfeksiyon varlığını tespit edilmiş, SRLV prevalansı %67.8 olarak bulunmuştur. Afyonkarahisar ilinde Arık ve ark (2015) tarafından 294 adet örneğin 17 adeti seropozitif tanımlanmış, %5.7 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Genetik ilişkilendirme yönünden Yaman ve ark (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 6 farklı ilden 11 tane sürüden 2266 adet serum örneğinin 287 adeti seropozitif olarak tanımlanmış, %12.66 oranından seroprevalans göstermiştir. Kars ilinde Gezer ve ark (2021) tarafından yapılan çalışmada incelenen 200 adet serum örnekten %16 oranında seroprevalans bildirilmiştir. Doğu Akdeniz Bölgesi'nden Doğan ve ark (2021) tarafından Kahramanmaraş, Osmaniye ve Hatay illerinden elde edilen 260 adet koyun lökosit ile serum örneklerinden 25 adeti enfeksiyon yönünden pozitif tespit edilmiş, SRLV prevalansı %9,62 olarak tespit edildiği rapor edilmiştir.

Marmara Bölgesi için SRLV prevalans oranları hakkında detaylı veri bulunmamaktadır. Bu çalışma Marmara Bölgesi'nde yer alan koyunculuk işletmelerinde SRLV seroprevalans oranlarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirildi.

Marmara Bölgesi'nde bulunan Balıkesir (n=60), Bilecik (n=20), Bursa (n=40), Çanakkale (n=45), Düzce (n=4), Edirne (n=20), İstanbul (n=20), Kırklareli (n=20), Kocaeli (n=4), Sakarya (n=20), Tekirdağ (n=20) ve Yalova (n=20) illerinden toplam 293 adet koyun serum örnekleri ELISA test yöntemiyle analiz edildi (Tablo 2.1). Test edilen 293 adet koyun serum örneğinden 54 adet örnek SRLV enfeksiyonu yönünden seropozitif tespit edildi. Marmara Bölgesi'nde SRLV seroprevalans oranı %18.43 olarak hesaplandı (Şekil 3.1). Araştırmada yer alan 12 ilin 10 ili seropozitif örnekler içerirken 2 ilin (Edirne ve Kırklareli) bütün örnekleri seronegatif belirlendi. SRLV enfeksiyonu tespit edilen iller %2,5 ile %75 oranında değişen seropozitif sonuçlar gösterdi (Şekil 3.2). Balıkesir (n=3), Bilecik (n=1), Bursa (n=2), Çanakkale (n=2), Düzce (n=1), Edirne (n=1), İstanbul (n=1), Kırklareli (n=1), Kocaeli (n=1), Sakarya (n=1), Tekirdağ (n=1) ve Yalova (n=1) illerinden toplam 16 adet işletme çalışmaya dahil edildi (Tablo 2.1). İncelenen 16 adet işletmeden 12 adet işletme seropozitif sonuçlar içerirken 4 adet işletmeye ait bütün örnekler seronegatif olarak tespit edildi. SRLV enfeksiyonu tespit edilen işletmelerde %5 ile %75 oranında değişen seropozitiflik oranları belirlendi (Şekil 3.4).

Diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında ABD, Çekya, Sırbistan, İspanya ve Çin ülkeleri ile bu çalışmada belirlenen prevalans değerleri yakınlık göstermektedir. İtalya ve Yunanistan koyun yetiştiriciliği yönünden süt üretimi üzerine gelişmiş olan Akdeniz ülkeleri içerisinde yer almaktadır (Pulina ve ark 2018). Süt sağım işlemlerinin, SRLV enfeksiyonlarının yayılmasının önemli yolu horizontal bulaşmayı kolaylaştıracağı düşünülmektedir (De Miguel ve ark 2021). Bu ülkelerin prevalans değerinin yüksekliği bunu destekleyen niteliktedir. Birleşik Krallık, Fransa, Norveç, Finlandiya, Almanya, Hollanda, İtalya, İsviçre ve İspanya kontrol programı uygulayan Avrupa ülkeleridir. Hastalığın eradikasyonu için yapılan kontrol programlarının etkinliği tartışmalıdır (De Miguel ve 2021). Finlandiya ve Birleşik Krallık'ta kontrol programlarının etkinliği görülmektedir. Ancak Almanya, İtalya, İsviçre ve İspanya'nın bilinen prevalans değerleri kontrol programları için belirtilen tartışmaları vurgulamaktadır. Yüksek prevalans değerleri ile yoğun üretim sistemi arasında doğru orantı bulunmaktadır (Minguijón ve ark 2015). Transport, ortak kullanıma sahip ağıl aletleri ve yetersiz havalandırma SRLV etkeninin horizontal bulaşmasını desteklemektedir (Barquero ve 2013). Düşük prevalans değerleri muhtemelen

bölgedeki düşük hayvan sayısıyla, yetiştirme yönü ve yönetim faktörleriyle ilişkilidir (De Miguel ve ark 2021).

Bu çalışmada %18.43 olarak tespit edilen Marmara Bölgesi'nin SRLV seroprevalans oranı Türkiye'de yapılan diğer çalışmalara (Burgu ve ark (1990), Tan ve Alkan (2002), Albayrak ve ark (2012) ve Muz ve ark (2013) göre daha düşük Yavru ve ark (2002), Karaoğlu ve ark (2003), Cimtay ve ark (2004), Akkan ve ark (2009), Preziuso ve ark (2010), Arık ve ark (2015), Ün ve ark (2018), Ameen ve Karapınar (2018), Yaman ve ark (2019), Gezer ve ark (2021) ve Doğan ve ark (2021) tarafından yapılan çalışmalardan ise yüksek bir prevalans tespit edildi. Azkur ve ark (2011) tarafından bildirilen seroprevalans oranına yakın sonuçlar belirlendi.

Bu çalışmada örneklenen koyunlardan 14 adeti 1 yaşa, 24 adeti 2 yaşa, 90 adeti 3 yaşa 64 adeti 4 yaşa, 60 adeti 5 yaşa, 41 adeti 6 ve üstü yaşa sahipti (Tablo 3.2). Albayrak ve ark (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada örneklenen koyunların yaş aralığının 3-7 olduğu belirtilmiştir. Yavru ve ark (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise örneklenen koyunlarının 2.5 yaş altında olduğu belirtilmiştir. Preziuso ve ark (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 542 adet örneklenen koyunların 250 adetinin 1 yaş altında olduğu belirtilmiştir. Gezer ve ark (2021) tarafından yapılan çalışmada örnekledikleri koyunların 171 adetinin 2 yaşa sahip olduğu, diğer 29 koyununda 3 yaşında olduğu bildirilmiştir. Kuşmak ve ark (2006) tarafından farklı sürü ve ırkların seroprevalans çalışmasında en yüksek seropozitif yaş aralığına 3-5 yaşlarında olduğu ifade edilmektedir. SRLV enfeksiyonunda koyunların yaş aralığı ile prevalans arasında ilişki bulunduğu bilinmektedir (Kuşmak ve ark 2006). Bu çalışmada elde edilen seroprevalans oranının Albayrak ve ark (2012) tarafından bulunan orandan düşük değerde, Yavru ve ark (2002), Preziuso ve ark (2010) ve Gezer ve ark (2021) tarafından bulunan orandan ise yüksek değerde olmasının yaş gruplarının dağılımındaki farklılıktan kaynaklanabileceği değerlendirildi.

Muz ve ark (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada örneklenen sürülerin çoğunda Maedi-Visna hastalığının klinik semptomlarıyla uyumlu respiratorik hastalıkların, düşük kondisyon, mastitis ve sporadik ölümlerin bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca daha önce seropozitif rapor edilen işletmelerin çalışmaya dahil edildiği ifade edilmiştir. SRLV enfeksiyonuna neden olabileceği klinik belirtilere sahip ve seropozitif koyunların bulunduğu sürülerde kontrol programlarının uygulaması ile prevalans oranının azalacağı ifade edilmektedir (Pérez ve ark 2013).

Prevalans oranları arasındaki farklılıkların bu belirtilen nedenlerden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada tespit edilen seroprevalans değerleri Ün ve ark (2018), Ameen ve Karapınar (2018), Yaman ve ark (2019) ve Doğan ve ark (2021) tarafından elde edilen seroprevalans değerlerinden yüksek bulundu. Bu çalışmada daha yüksek seropozitif sonuç tespit edilmesi örneklenen koyunların yaş aralığı gibi etkenlerden seroprevalans oranında farklılıklara neden olabileceği ifade edilmektedir (Preziuso ve ark 2010). Ayrıca örneklenen koyun sayısı, örnekleme yöntemi ve araştırmalarda yer alan bölgelerin farklı olması gibi nedenlere bağlı olarak daha yüksek tespit edildiği değerlendirildi.

Bu çalışmada Merinos ırkı koyunlarda (n=110) %23.64, Kıvırcık ırkı koyunlarda (138) %13.77, Karacabey Merinos ırkı koyunlarda (n=15) %0, Akkaraman ırkı koyunlarda (n=20) %15 ve Sakız ırkı koyunlarda (n=10) %75 oranında pozitifliğe sahip olduğu görüldü (Tablo 3.1). Burgu ve ark (1990) tarafından yapılan araştırmada Merinos, Sakız ve Kıvırcık ırkı koyunların yüksek seroprevalans oranına sahip oldukları ifade edilmiştir. Yaman ve ark (2019) tarafından yapılan çalışmada Karacabey Merinosu ırkı koyun sürülerinin Sakız ve Kıvırcık ırkı koyun sürülerinden düşük oranda seroprevalans yüzdesine sahip olduğunu bildirilmiştir.

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından AGID testi hayvan ticareti, kontrol programları ve SRLV enfeksiyonlarının rutin taraması için tercih edilen yöntem olarak önerilmiştir (De Andrés ve ark 2005). Devam eden süreçte ticari ELISA test kitlerinin yaygın kullanılmasından sonra AGID testinin rutin taramada kullanılması amaçlarından ziyade ELISA test sonuçlarının değerlendirmesinde bir konfirmasyon testi olarak kullanılmıştır (Minguijón ve ark 2015, Michiels ve ark 2018). Finlandiya'da uygulanan ulusal kontrol programında tarama ve konfirmasyon için iki farklı ticari AGID test kiti kullanılmıştır (Sihvonen ve ark 2000). Norveç'te uygulanan kontrol programında ise tarama için ticari ELISA test kiti ve konfirmasyon içinde ticari AGID test kiti kullanılmıştır. (Toft ve ark 2007, Kampen ve ark 2008). Birleşik Krallık'ta uygulanan kontrol programlarında ise yüksek spesifitesinden dolayı ticari AGID test kiti kullanılmış ancak devam eden süreçte duyarlılığı artırmak amacıyla rutin tarama testlerinde sensitivitesi yüksek olan ticari ELISA test kiti kullanılmıştır (Synge ve Ritchie 2010). Dünya genelinde yapılan çalışmalarda AGID testi, 1981 ile 2000 yılları arasında en yaygın kullanılan tanı testi olarak yer almıştır. ELISA testi ise

2001 ile 2020 yılları arasında yaygın kullanılan tanı testi olmuştur. Ancak ELISA testinden sonra AGID testi en yaygın kullanılan tanı testi olarak belirtilmiştir (De Miguel ve ark 2021). Türkiye’de AGID test ve ELISA test metotlarının da kullanıldığı belirtilmiştir (Doğan ve ark 2021). Ancak bugüne kadar SRLV enfeksiyonun serolojik teşhisi yönünden ELISA testi ile AGID testinin karşılaştırmalı olarak birlikte değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada ELISA testi ile pozitif (n=54) ve negatif (n=47) bulunan toplam 100 adet serum örnekleri AGID testi ile analiz edildi. AGID testi ile analiz edilen bu 100 adet örnekten 43 adet örnek pozitif diğer 57 adet örnek ise negatif tespit edildi. AGID testi ile pozitif tespit edilen 43 adet örneğin tamamı ELISA testinde pozitif iken negatif tespit edilen 57 adet örneğin 11 adetinin ELISA testinde pozitif olduğu görüldü. İşletme düzeyinden ELISA testi ile pozitif profile sahip olan 12 adet işletmenin, AGID testi ile negatif bulunan 11 adet örnek nedeniyle mevcut profilinin değişmediği görüldü (Tablo 3.3).

Analiz edilen örnekler düzeyinde AGID ve ELISA testinin kappa değeri 0.7824, güven sınırı (%95) içerisinde 0.6641 ile 0.9008 alt ve üst değerlere sahip olduğu belirlendi (Tablo 3.5). Teşhis performanslarını değerlendirmek için sensitivite, spesifite, doğruluk oranı, PPD ve NPD parametreleri kullanıldı. ELISA testi referans test olarak kabul edildiğinde AGID testi sırasıyla %80, %100, %89, %100 ve %81 değerlerine sahip bulundu. AGID testi referans kabul edildiğinde ise ELISA testi %100, %81, %89, %80 ve %100 değerlerine sahip bulundu (Tablo 3.6).

AGID ve ELISA testinin karşılaştırılmalarının yapıldığı çalışmalarda AGID testinin yüksek spesifite değerine sahip olduğu ancak nispeten düşük bir sensitivite değerine sahip olduğu bununla birlikte ELISA testinin ise AGID testinin göre yüksek sensitivite değerine sahip olduğu belirtilmektedir (De Andrés ve ark 2005). Bu çalışmada AGID testinin %80 sensitivite ile %100 spesifite değerleri, ELISA testinin ise %100 sensitivite ile %81 spesifite değerleri daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik gösterdiği belirlendi.

Varea ve ark (2001) tarafından 1.694 adet örnek kullanılarak yapılan karşılaştırma çalışmasında AGID sonuçları referans olarak kabul edilerek kappa değeri 0,73 bulunduğunu, ELISA sensitivite, spesifite ve doğruluk oranı sırasıyla %94, %84.2 ve %89.1 değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir. ELISA testinin performans

parametreleri bu çalışma ile yakın değerlerde olduğu ifade edilebilir. Ancak kappa değerindeki kısmi farklılık örnek sayısı ile ilişkilendirildi.

Karanikolaou ve ark (2005) tarafından yapılan test metotlarının karşılaştırılması çalışmasında SRLV enfeksiyonu öyküsü olan 6 adet sürüden elde ettikleri 143 adet örnek üzerinden AGID ve ELISA testinin doğruluk oranı %71.3 değerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada doğruluk oranı değeri (%89) daha yüksek belirlendi. SRLV enfeksiyonuna karşı gelişen antikor yanıtının zaman içinde değişkenliğe sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca hayvanlar arasında bireysel humoral yanıtın gelişiminde farklılıklar olabileceği bildirilmektedir (Stonos ve ark 2014). Bu çalışma ile belirlenen farklılığın enfeksiyona özgü humoral bağışıklık tepkilerindeki değişimlerden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Michiels ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmada sensitivite, spesifite, PPD ve NPD oranlarını ELISA testinin için %100, %97.8, %82.3 ve %100 değerinde, AGID testi için ise tüm oranları %100 oranında olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar (Michiels ve ark 2018) 553 adet koyun serum örneğinden 2 farklı ticari AGID test kiti ile pozitif tespit ettikleri 51 adet örneği referans örnek olarak kullandığını ifade etmektedir. AGID testi için spesifite ve PPD oranları ile ELISA testi için sensitivite, PPD ve NPD oranları bu çalışma ile uyum göstermektedir. AGID testi için sensitivite ve NPD oranları ile ELISA testi için spesifite oranında ise farklılık görülmektedir. Bu farkın nedeni örnek sayısı ve referans örneklerin AGID testi baz alınarak sınıflandırılmasından kaynaklanmış olabileceği ifade edilebilir.

SRLV suşlarının karakterizasyonu filogenetik analiz ile yapılmaktadır (Shah ve ark 2004). Filogenetik analiz ile A, B, C, D ve E olmak üzere beş ana filogenetik grup bilinmektedir (Grego ve ark 2007). VMV benzeri suşları Genotip A'yı temsil etmektedir. Genotip A yüksek genetik heterojenite sahip olup, 27 alt tip (A1-A27) içermektedir (Olech ve ark 2022). CAEV benzeri suşları ise Genotip B'yi temsil etmekte olup, beş alt tip (B1-B5) içermektedir (Michiels ve ark 2020). Genotip D grubu içerisinde ise İsviçre ve İspanya'dan tespit edilen birkaç izolat yer almaktadır ancak genotip A içerisinde sınıflandırılması öngörülmektedir (Ramírez ve ark 2013, Arcangeli ve ark 2022). Genotip C ve E içerisinde yer alan viruslar ise sırasıyla Norveç ve İtalyan suşları ile sınırlı olduğu ifade edilmektedir. Genotip E grubu E1 ve E2 olmak üzere 2 alt tip içermektedir (Giammarioli ve ark 2011).

Türkiye’de yapılan moleküler çalışmalarda Genotip A ve Genotip B gruplarının tespitinin yapıldığı bildirilmiştir (Bertolotti ve ark 2011, Muz ve ark 2013, Doğan ve ark 2021). Bertolotti ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmada 1 adet koyun örneğinin İtalyan izolatları ile benzer sekans dizinleri içerdiği ve Genotip B içerisinde B3 alt tip ile yakın olduğu ifade edilmektedir. Muz ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada yer alan izolatların ABD ve Yunanistan dizinleri ile yakınlık gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar (Muz ve ark 2013) Türkiye’de Genotip A grubunun koyun sürülerinde sirküle olduğunu, alt tip olarak A2, A3, A5, A9 ve A11’i tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Doğan ve ark (2021) tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yapılan çalışmada koyun örnekleri sekanslarının Genotip B içerisinde yer aldığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada 15 adet koyun örneğinden 1 adet Düzce ve 1 adette Bilecik’ten olmak üzere toplam 2 örnek pozitif bulundu (Şekil 3.12, Şekil 3.13). Pozitif tespit edilen amplikonlar sekans analizine alınarak dizinler elde edildi (Şekil 3.14). Elde edilen dizinler ile referans dizinler ve BLAST programında özdeşlik yüzdesi %80 olan dizinler MEGA11 programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu ve genetik uzaklık (pairwise distance) analizi yapıldı.

Bilecik izolatu (cons2-11), referans dizinler ile olan genetik uzaklık analizinde Genotip A referans suşları LV-1 (M10608) ve K1514 (M60609) ile %15 fark gösterdiği belirlendi. Genotip B referans suşları SRLV001 (MG554402) ile %77, Ov496 (FJ195346) ile %44, CAEV-CO (M33677) ile %53, Gansu (AY900630) ile %61, Volterra (JF502417) ile %56 ve Fonni (JF502416) ile %38 fark gösterdi. Genotip C referans suşu 1GA (AF322109) ile yaklaşık %58 farka sahip bulundu. Genotip E referans suşları Roccaverano (EU293537) ile %48 ve Seui (GQ381130) ile %58 fark gösterdiği görüldü. Bilecik izolatının en az farkı Genotip A ile gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.16).

Düzce izolatu (cons5-81), referans dizinler ile olan genetik uzaklık analizinde Genotip A referans suşları LV-1 (M10608) ve K1514 (M60609) ile %15 fark gösterdiği belirlendi. Genotip B referans suşları SRLV001 (MG554402) ile %81, Ov496 (FJ195346) ile %38, CAEV-CO (M33677) ile %51, Gansu (AY900630) ile %53, Volterra (JF502417) ile %53 ve Fonni (JF502416) ile %35 fark gösterdi. Genotip C referans suşu 1GA (AF322109) ile yaklaşık %55 farka sahip bulundu. Genotip E referans suşları Roccaverano (EU293537) ile %42 ve Seui (GQ381130) ile %51 fark

gösterdiği görüldü. Düzce izolatının en az farkı Genotip A ile gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.16).

BLAST programında özdeşlik yüzdesi %80 olan dizinlerin Türkiye, Yunanistan, ABD ve Polonya’da tespit edilen izolatlar olduğu görüldü. Bilecik ve Düzce izolatları Türkiye’de daha önce tespit edilen TR-2007-B40 (GQ862786), TR-2007-Eco2-35 (GQ862789), TR-2007-K55 (GQ862799), TR-2007-K58 (GQ862800) ve TR-2007-K60 (GQ862801) izolatları ile %6 ila %12 arasında değişen oranlarda farklılığa sahip oldukları belirlendi. Yunanistan’da tespit edilen 10-blood (DQ647677), MVV-Gr-LTR19 (DQ084444) ve 25-blood (DQ647681) izolatlarının ise %12 ve %13 oranlarında farka sahip oldukları görüldü. ABD’de tespit edilen H2700.7 5' (HM053108), H2695.2 5' (HM053096) ve R6139.8 5' (HM053397) izolatları ile %13 ila %19 arasında değişen oranlarda farklılığa sahip oldukları belirlendi. Polonya’da tespit edilen 7096 (ON637559), 0016 (ON637582) ve 1 (ON637590) izolatları ile %12 ila %20 arasında değişen oranlarda farklılığa sahip oldukları belirlendi (Şekil 3.18).

Filogenetik ağaç yerleşimlerinde bu çalışmada elde edilen izolatların referans suşlar içerisinde Genotip A referans suşlarına yakın olduğu görüldü (Şekil 3.15). Ülke izolatları içerisinde ise Türkiye izolatları ile ortak dal yerleşimi gösterdi. Alt tip izolatlarının yer aldığı filogenetik ağaç yerleşiminde ise A24 dizinleri ile yakın olduğu görüldü. A24 izolatları 1 (ON637590) ve 4 (ON637591) ile Bilecik izolatı %11 farka, Düzce izolatının ise %6 farka sahip olduğu belirlendi. Tespit edilen örneklerin LTR gen bölgesi dizinlerinin, filogenetik analizler sonucunda Genotip A içerisinde karakterize olduğu belirlendi (Şekil 3.17).

Bertolotti ve ark (2011) ile Doğan ve ark (2021) tarafından yapılan çalışmalarda incelenen dizinlerin Genotip B içerisinde yer aldığı bildirilmiştir. Muz ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada incelenen dizinlerin Genotip A içerisinde A2, A3, A5, A9 ve A11 olarak tanımladığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada incelenen örneklerin ise Genotip A karakterine sahip olduğu ve A24 alt tipi ile kümelendiği belirlendi. LTR dizilerinin genetik analizi, bu çalışmada SRLV Genotip A içerisinde alt tipleri arasında değişkenliği ortaya çıkardı. SRLV etkeninin yüksek genetik değişim ve antijenik heterojenlik göstermesi nedeni ile çeşitli genotiplerin ve farklı alt tiplerin tespiti ülkesel ya da bölgesel çalışmalarda görülebilmektedir (Arcangeli ve ark 2022). Bu nedenle genotipler içerisinde farklı alt tiplerin tespiti gerçekleştirilebilmektedir.

Bu çalışmada elden edilen LTR gen dizinlerinin Türkiye, Yunanistan, ABD ve Polonya dizinleri ile özdeşlik yüzdesinin yüksek olduğu tespit edildi. Türkiye’de elde edilen dizinlerin ABD ve Yunanistan ile yakın ilişkili olduğu Muz ve ark (2013) tarafından da bildirilmektedir. BLAST programında özdeşlik yüzdesi %80 olan dizinler içerisinde yer alan 7096 (ON637559), 0016 (ON637582) ve 1 (ON637590) izolatlarının Olech ve ark (2022) tarafından Polonya’da yapılan çalışmaya ait olduğu görülmektedir. Bu araştırmada Muz ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmaya ek olarak Polonya’nın yer alması verilerin güncelliğinden kaynaklanabileceği ifade edilebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Small Ruminant Lentivirus enfeksiyonlarının koyunlarda neden olduğu Maedi-Visna hastalığı Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır. Bu araştırmada Marmara Bölgesi'nde SRLV enfeksiyonun seroprevalans oranı belirlendi. Hastalığın serolojik teşhisinde kullanılan AGID ve ELISA testlerinin karşılaştırılması yapıldı. Etkenin karakterizasyonuna yönelik elde edilen dizinlerin filogenetik analizi ile Genotip A içerisinde yer aldığı belirlendi. Genotip A içerisinde A24 alt tipi ile benzerlik gösterdiği görüldü.

Small Ruminant Lentivirus enfeksiyonlarının epizootiyolojisi ve kontrol stratejilerinin planlanmasında bölgesel verilere ihtiyaç duyulmaktadır. Marmara Bölgesi'nde yer alan illerin tamamının örneklediği bölgesel bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu çalışma Marmara Bölgesi'nin tamamının örneklenmesi ve seroprevalansın belirlenerek moleküler karakterizasyonlarının yapılmış olması yönünden değerlendirildiğinde ilk rapor olma özelliği taşımaktadır. Elde edilen verilerin ulusal ve uluslararası literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Ülkemizde “İhbari Mecburi Hastalıklar Listesi” ile belirtilen hayvan hastalıklarına yönelik eradikasyon çalışmaları uygulanmaktadır. SRLV enfeksiyonlarının bu liste içerisinde yer almaması, hayvan nakilleri ve ortak mera alanlarının kullanımı nedeniyle SRLV enfeksiyonu yönünden ari olan sürüler için riskler oluşmaktadır. Bu kapsamda SRLV enfeksiyonları yönünden ulusal ve/veya sürü düzeyinde koruma ve kontrol tedbirlerinin uygulanması faydalı olacaktır.

Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü tarafından SRLV enfeksiyonlarının kontrol programlarında ve sörveyans çalışmalarında AGID testi ile ELISA testinin etkin olduğunu belirtmektedir. Bu araştırmada her iki testinde birbiri ile uyum gösterdikleri belirlendi. Ancak AGID testinin uygulamadaki dezavantajları ve ELISA testine göre düşük bir sensitivite değerine sahip olmasından dolayı tarama testlerinde ELISA testinin kullanılması daha yararlı olacaktır. Bundan sonraki çalışmalarda farklı ELISA test kitlerinin karşılaştırılması SRLV enfeksiyonlarının teşhisi açısından katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada LTR gen bölgesine yönelik kullanılan konvansiyonel PCR analizi optimize edildi. LTR gen bölgesi SRLV genotiplerinin sınıflandırılmasında

kullanılabilmektedir. Bu nedenle optimize edilen metodun hem SRLV'nin teşhisinde hem de SRLV'nin filogenetik analizlerin de kullanılabileceği öngörülmektedir.

Marmara Bölgesi'nde incelenen örnekler düzeyinde Genotip A varlığı bu araştırma ile ortaya konuldu. Genotip A'nın diğer filogenetik gruplara göre yüksek heterojeniteye sahip olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı gelecekte teşhis metotlarının etkinliğinin değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Small Ruminant Lentivirus etkeninin mutasyonları ve antijenik değişimleri nedeniyle serolojik ve moleküler yöntemler ile dönemsel olarak taramaların yapılmasının faydalı olacağını önermekteyiz.

Ülkemizde SRLV enfeksiyonlarına yönelik koruma ve kontrol yönünden planlanacak çeşitli derecelerdeki programlara bu çalışmada belirtilen etken karakterizasyonunun, tanı yöntemlerinin değerlendirilmesinin ve bölgesel seroprevalans değerlerinin katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

6. KAYNAKÇA

- Aalberts, M. Peterson K. Moll L. Vellema P. & van Maanen C, 2021. Evaluation of five SRLV ELISAs for fitness for purpose in sheep and goat accreditation schemes in the Netherlands. *Small Rumin Res*, 202, 106452.
- Agnarsdóttir G, Thorsteinsdóttir H, Óskarsson T, Matthíasdóttir S, St Haflídadóttir B, Andrésson ÓS, Andrésdóttir V, 2000. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol*, 81(Pt 8), 1901-5.
- Akkan HA, Karaca M, Tutuncu M, Keles I, İlhan F, Cetin Y, Ozkan C, Bakir B, Tasal I, 2009. Investigation of the seroprevalence of Maedi-Visna in the region of Van using ELISA and histopathological findings. *J Anim Vet Adv*, 8, 8, 1495-8.
- Albayrak H, Yazici Z, Okur-Gumusova S, Ozan E, 2012. Maedi-visna virus infection in Karayaka and Amasya Herik breed sheep from provinces in northern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 44(5), 939-41.
- Alibaşoğlu M, Arda M, 1975. Koyunlarda pulmoner adenomatozis'inin Türkiye'de durumu ile patoloji ve etiyolojisinin araştırılması. *Tübitak-VHAG yayınları*, 273/4, 111.
- Alves JRA, Limeira CH, Lima GMS, Pinheiro RR, Alves FSF, Dos Santos VWS, De Azevedo SS, Alves CJ, 2017. Epidemiological characterization and risk factors associated with lentiviral infection of small ruminants at animal fairs in the semiarid Sertão region of Pernambuco, Brazilian semiarid. *Semin. Ciênc. Agrárias*, 38, 1875-86.
- Akkoç A, Kocatürk M, Alasonyalılar Demirer A, Şentürk S, Renzoni G, Preziuso S, 2011. Maedi-Visna virus infection in a Merino lamb with nervous signs. *Turk J Vet Anim Sci*, 35(6), 467- 70.
- Ameen PS, Karapınar Z, 2018. Seroprevalence of visna-maedi virus (VMV) and border disease virus (BDV) in van province and around. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 70, 1029-35.
- Andrésdóttir V, 2018. Maedi-visna virus as a model for HIV. *Icel Agric Sci*, 31, 23-47.
- Angelopoulou K, Brellou GD, Vlemmas I, 2006. Detection of Maedi-Visna Virus in the kidneys of naturally infected sheep. *J Comp Path*, 134, 329-35.
- Arcangeli C, Torricelli M, Sebastiani C, Lucarelli D, Ciullo M, Passamonti F, Giammarioli M, Biagetti M, 2022. Genetic Characterization of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) Circulating in Naturally Infected Sheep in Central Italy. *Viruses*, 25, 14(4), 686.
- Arık C, Acar A, Gür S, 2015. Afyonkarahisar ili ve çevresinde Maedi- Visna Virus enfeksiyonunun klinik ve serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 8(1), 39-44.
- Ayelet G, Roger F, Tibbo M, Tembely S, 2001. Survey of Maedi-Visna (MV) in Ethiopian Highland Sheep. *Veter J*, 161, 208–10.
- Azevedo DA, Santos VW, Sousa AL, Peixoto RM, Pinheiro RR, Andrioli A, & Teixeira MF, 2018. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84.
- Azkur AK, Gazyagcı S, Aslan ME, 2011. Serological and Epidemiological Investigation of Bluetongue, Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis Viruses in Small Ruminant in Kirikkale District in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17(5), 803-809.
- Barquero N, Arjona A, Domenech A, Toural C, De Las Heras A, Fernández- Garayzabal J.F, Ruiz-Santa Quiteria JA, Gomez-Lucia E, 2011. Paper: Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet Rec*, 168, 20.
- Barquero N, Domenech A, Arjona A, Fernández-Garayzabal JF, Ruiz-Santa- Quiteria JA, Gomez-Lucia E, 2013. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. *Res Vet Sci*, 94, 817-9.
- Barquero N, Domenech A, Gomez-Lucia E, 2015. Infections by Small Ruminant Lentiviruses: Diagnosis, Epidemiology and Pathogenesis. LAP Lambert Academic Publishing.

- Barquero N, Gomez-Lucia E, Arjona A, Toural C, Heras A, Fernández-Garayzábal JF, Quiteria JA, Doménech A, 2013. Investigation of risk factors associated with infections caused by small ruminant lentiviruses. *Bull Veter Inst Pulawy*, 57, 473-8.
- Barros SC, Andrésdóttir V, Fevereiro M, 2005. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Arch Virol*, 150(2), 201-13.
- Barros SC, Ramos F, Duarte M, Fagulha T, Cruz B, Fevereiro M. 2004. Genomic characterization of a slow/low maedi visna virus. *Virus Genes*, 29(2), 199-210.
- Barták P, Šimek B, Václavek P, Čurn V, Plodková H, Tonka T, Farková B, Vernerová K, Vejčík A, 2018. Genetic characterisation of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from the Czech Republic. *Acta Vet Brno*, 87, 19-26.
- Beguiría S, 2006. Validation and Evaluation of Predictive Models in Hazard Assessment and Risk Management. *Nat Hazards*, 37, 315-329.
- Belino ED, Ezeifeke GO, 1984. Maedi-visna antibodies in sheep and goats in Nigeria. *Vet Rec*, 114, 570.
- Benavides J, Fuertes M, García-Pariente C, Ferreras MC, García Marín JF, Pérez V, 2006. Natural cases of Visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. *J Comp Pathol*, 134(2-3), 219-30.
- Benavides J, García-Pariente C, Ferreras MC, Fuertes M, García-Marín JF, Pérez V, 2007. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet J*, 174(3), 655-8.
- Benavides J, García-Pariente C, Fuertes M, 2009. Maedi-Visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *J Comp Pathol*, 140(1), 1-11.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW, 2013. GenBank, *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D, 36-42.
- Berriatua E, Alvarez V, Extramiana B, González L, Daltabuit M, Juste R, 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev Vet Med*, 12, 60(4), 265-79.
- Bertolotti L, Mazzei M, Puggioni G, Carrozza ML, Dei Giudici S, Muz D, Juganaru M, Patta C, Tolari F, Rosati S, 2011. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. *J Gen Virol*, 92(Pt 8), 1923-9.
- Blacklaws B, Harkiss GD, 2010. Small ruminant lentiviruses and human immunodeficiency virus: cousins that take a long view. *Curr HIV Res*, 8, 26-52.
- Blacklaws BA, 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35(3), 259-69.
- Blacklaws BA, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Watt NJ, de Andres D, Klein D, Harkiss GD, 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*, 14, 101(3), 199-208.
- Bolea R, Monleón E, Carrasco L, Vargas A, de Andrés D, Amorena B, Badiola JJ, Luján L, 2006. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Vet Res*, 37(1), 133-44.
- Borquez Cuevas MY, Hernández Chávez JF, Armenta Leyva B, Cedillo Cobián JR, Molina Barrios RM, 2021. Ovine Progressive Pneumonia: Diagnosis and Seroprevalence in the South of Sonora, Mexico. *Case Rep Vet Med*, 6623888.
- Boshoff CH, Dungu B, Williams R, Vorster J, Conradie JD, Verwoerd DW, York DF, 1997. Detection of Maedi-Visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p25 recombinant protein ELISA and a modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J Virol Methods*, 63(1-2), 47-56.
- Bouljihad M, Leipold HW, 1994. Ovine Lentiviral Infection (Maedi/Visna) in Morocco: A Serologic and Postmortem Survey. *J Vet Med Ser A*, 41, 317-28.
- Brajon G, Mandas D, Liciardi M, Taccori F, Meloni M, Corrias F, Montaldo C, Coghe F, Casciari C, Giammarioli M, Orrù G, 2012. Development and Field Testing of a Real-Time PCR Assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol J*, 6, 82-90.

- Brellou GD, Angelopoulou K, Poutahidis T, Vlemmas I, 2007. Detection of maedi-visna virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *J Comp Pathol*, 136(1), 27-35.
- Brinkhof J, van Maanen C, 2007. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol*, 14(9), 1210-4.
- Brinkhof JMA, van Maanen C, Wigger R, Peterson, K, Houwers DJ, 2008. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, 147, 338-44.
- Brodie SJ, de la Concha-Bermejillo A, Koenig G, Snowden GD, DeMartini JC, 1994. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. *J Infect Dis*, 169(3), 653-7.
- Broughton-Neiswanger LE, White SN, Knowles DP, Mousel MR, Lewis GS, Herndon DR, Herrmann-Hoesing LM, 2010. Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe flock: a molecular epidemiology study. *Infect Genet Evol*, 10(7), 998-1007.
- Burgu I, Tokar A, Akça Y, Yazıcı Z, Özkul A, 1990. Türkiye’de visna-maedi enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 37, 538-53.
- Cambbell BJ, Avery RJ, 1996. Sequence analysis and transcriptional activity of the LTR of OLV-CU1, a North American ovine lentivirus. *J Gen Virol*, 77, 2999-3004.
- Cana A, Taylor N, Honhold N, Gjinovci V, Osmani A, Nardelli S, Murati B, Spahiu J, Mehmetkaj D, Alishani M, 2020. Sero-prevalence survey of small ruminant lentivirus (SRLV) infections in Kosovo. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 26, 1-8.
- Cardinaux L, Zahno ML, Deubelbeiss M, Zannoni R, Vogt HR, Bertoni G, 2013. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. *Vet Microbiol*, 23, 162(2-4), 572-81.
- Carrozza ML, Mazzei M, Bandecchi P, Fraiser C, Pérez M, Suzan-Monti M, de Andrés D, Amorena B, Rosati S, Andrésdottir V, Lujan L, Pepin M, Blacklaws B, Tolari F, Harkiss GD, 2010. Development and comparison of strain specific gag and pol real-time PCR assays for the detection of Visna/maedi virus. *J Virol Methods*, 165(2), 161-7.
- Cecco BS de, Santos IR dos, Molossi FA, Canal CW, Barros CSL de, Driemeier D, Sonne L, Pavarini, SP, 2023. Viral diseases of sheep in Brazil: a review and current status. *Ciência Rural*, 53(8), e20220218.
- Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, Rahal A, Malik Y, Dhama K, Pal A, Prasad M, 2014. Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Vet Med Int*, 508304.
- Chassalevris T, Chaintoutis SC, Apostolidi ED, Giadinis ND, Vlemmas I, Brellou GD, Dovas CI, 2020. A highly sensitive semi-nested real-time PCR utilizing oligospermene-conjugated degenerate primers for the detection of diverse strains of small ruminant lentiviruses. *Mol Cell Probes*, 51, 101528.
- Christodouloupoulos G, 2006. Maedi–Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Rumin Res*, 62, 47-53.
- Clements JE, Payne SL. 1994. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Res*, 32, 97-109.
- Clements JE, Zink MC, 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev*, 9, 100-17.
- Coffin J, Blomberg J, Fan H, Gifford R, Hatzioannou T, Lindemann D, Mayer J, Stoye J, Tristem M, Johnson W, 2021. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *J Gen Virol*, 102(12), 001712.
- Colitti B, Coradduzza E, Puggioni G, Capucchio MT, Reina R, Bertolotti L, Rosati S, 2019. A new approach for Small Ruminant Lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains. *PLoS One*, 21, 14(2), e0212585.
- Crespo H, Reina R, Glaria I, Ramírez H, de Andrés X, Jáuregui P, Luján L, Martínez-Pomares L, Amorena B, de Andrés DF, 2011. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. *Vet Res*, 7, 42(1), 28.

- Cross R, Smith C, Moorhead P, 1975. Vertical transmission of progressive pneumonia of sheep. *Am J Vet Res*, 36, 465-8.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Jackson TA, 1981. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res*, 42, 1795-7.
- Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Schmerr MJ, Brogden KA, 1988. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet Microbiol*, 17(3), 237-50.
- Çimtay İ, Keskin O, Şahin T, 2004. Şanlıurfa yöresindeki koyun ve keçilerde bazı lentivirus enfeksiyonlarının araştırılması. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 23(1-2-3), 33-8.
- Daltabuit-test M, Juste RA, Berriatua E, 2008. Desarrollo De Una Técnica De Pcr Para Detectar Virus Maedi-visna (Vmv) Libre E Integrado En Células Y Aplicación Al Estudio De La Infección Calostrál En Corderos. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 22, 57-66.
- Davies P, Jones S, Dunham S, Tarlinton RE, 2023. Associations between small ruminant lentivirus infection and total milk yield and somatic cell count in a dairy sheep flock. *Vet Rec*, 21, e2731.
- de Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss GD, 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol*, 25, 107(1-2), 49-62.
- de Miguel R, Arrieta M, Rodríguez-Largo A, Echeverría I, Resendiz R, Pérez E, Ruiz H, Pérez M, de Andrés D, Reina R, de Blas I, Luján L, 2021. Worldwide Prevalence of Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals*, 11(3), 784.
- De Regge N, Cay B, 2013. Development, validation and evaluation of added diagnostic value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant lentiviruses. *J Virol Methods*, 194, 250-7.
- Didugu H, Sagi SBR, Reddy CEN, Kishore KN, Reddy MV, Vishnu PG, 2016. First report of Maedi-Visna and Caprine Arthritis- Encephalitis viruses in Krishna district, Andhra Pradesh, India. *J Anim Res*, 6, 177.
- Doğan F, Ataseven VS, Dağalp SB, Ergün Y, 2021. Küçük ruminant lentivirus enfeksiyonlarının serolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 37, 3, 193-201
- Echeverría I, De Miguel R, De Pablo-Maiso L, Glaria I, Benito AA, De Blas I, De Andrés D, Luján L, Reina R, 2020. Multi-Platform Detection of Small Ruminant Lentivirus Antibodies and Provirus as Biomarkers of Production Losses. *Front Vet Sci*, 30, 7, 182.
- 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, 240-246.
- Esparza-Baquer A, Larruskain A, Mateo-Abad M, 2015. SNPs in APOBEC3 cytosine deaminases and their association with Visna/Maedi disease progression. *Vet Immunol Immunopathol*, 163(3-4), 125-33.
- Extramiana AB, González L, Cortabarría N, García M, Juste RA, 2002. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Rumin Res*, 44, 109-18.
- Feverreiro M, Barros S, Fagulha T, 1999. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J Virol Methods*, 81(1-2), 101-8.
- Fournier D, Campbell JR, Middleton DM, 2006. Prevalence of maedi-visna infection in culled ewes in Alberta. *Can Vet J*, 47, 460-6.
- Franzdóttir SR, Ólafsdóttir K, Jónsson SR, Strobel H, Andrússon ÓS, Andrúsdóttir V, 2016. Two mutations in the vif gene of maedi-visna virus have different phenotypes, indicating more than one function of Vif. *Virology*, 15, 488, 37-42.
- Gayo E, Polledo L, Balseiro A, Martínez CP, García Iglesias MJ, Preziuso S, Rossi G, García Marín JF, 2018. Inflammatory Lesion Patterns in Target Organs of Visna/Maedi in Sheep and their Significance in the Pathogenesis and Diagnosis of the Infection. *J Comp Pathol*, 159, 49-56.

- Gayo E, Polledo L, Magalde A, Balseiro A, García Iglesias MJ, Pérez Martínez C, Preziuso S, Rossi G, García Marín JF, 2019. Characterization of minimal lesions related to the presence of visna/maedi virus in the mammary gland and milk of dairy sheep. *BMC Vet Res*, 10, 15(1), 109.
- Geballe AP, Ventura P, Stowring L, Haase AT, 1985. Quantitative analysis of visna virus replication in vivo. *Virology*, 141, 148-54.
- Germain K, Valas S, 2006. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Res*, 120(1-2), 156-62.
- Gerstner S, Adamovicz JJ, Duncan JV, Laegreid WW, Marshall KL, Logan JR, Schumaker BA, 2015. Prevalence of and risk factors associated with ovine progressive pneumonia in Wyoming sheep flocks. *J Am Veter Med Assoc*, 247, 932-7
- Gezer T, Akyüz E, Gökçe G, 2021. Investigation of Seroprevalence of Maedi-Visna Infection in some Sheep Flocks in Kars Province, Turkey. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 14 (1), 48-51.
- Giammarioli M, Bazzocchi M, Puggioni G, Brajon G, Dei Giudici S, Taccori F, Feliziani F, De Mia GM, 2011. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*, 43(3), 380-4.
- Giangaspero M, Osawa T, Orusa R, Frossard J.-P, Naidu B, Robetto S, Tatami S, Takagi E, Moriya H, Okura N, 2011. Epidemiological survey for visna-maedi among sheep in northern prefectures of Japan. *Vet Ital*, 47, 437-51.
- Giangaspero M, Tabbaa D, Nishikawa H, Vanopdenbosh E, 1993. Epidemiological survey of the Maedi Visna (MV) virus in Syrian Awassi sheep. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 46(3), 431-4.
- Gibson L, Dun K, Baird A, 2018. The true cost of maedi visna virus (MVV) infection in a commercial flock. *Livestock*, 23(5), 238-43.
- Gifford RJ, 2012. Viral evolution in deep time: lentiviruses and mammals. *Trends Genet*, 28(2), 89-100.
- Gilbert M, Nicolas G, Cinardi G, Van Boeckel TP, Vanwambeke SO, Wint GRW, Robinson TP, 2010. Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in Scientific Data, 5.
- Girgin H, Aydın N, Yonguç AD, Aksoy E, Çorak R, 1987. Ve Şimdi Koyunların Viral Maedi-Visna'sı Türkiye'de. *Etlik Vet Mikrob Derg*, 6 (1), 9-22.
- Gjerset B, Rimstad E, Teige J, Soetaert K, Jonassen CM, 2009. Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. *Vet Microbiol*, 135, 231-8.
- Gjerset B, Storset AK, Rimstad E, 2006. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J Gen Virol*, 87(Pt 3), 573-80.
- Glaria I, Reina R, Crespo H, de Andrés X, Ramírez H, Biescas E, Pérez MM, Badiola J, Luján L, Amorena B, de Andrés D, 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. *Vet Microbiol*, 138(1-2), 156-62.
- Glaria I, Reina R, Ramírez H, de Andrés X, Crespo H, Jauregui P, Salazar E, Luján L, Pérez MM, Benavides J, Pérez V, Polledo L, García-Marín JF, Riezu JJ, Borrás F, Amorena B, de Andrés D, 2012. Visna/Maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. *Vet Microbiol*, 23,155(2-4), 137-46.
- Gomez-Lucia E, Barquero N, Domenech A, 2018. Maedi-Visna virus: current perspectives. *Vet Med (Auckl)*, 21,9, 11-21.
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S, 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol*, 88(Pt 12), 3423-7.
- Haase AT, 1986. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, 322, 130-6.
- Harris R, 1976. Slow virus diseases of animals and Man. *Br Med J*, 1(6024), 1540.

- Harris RS, Dudley JP, 2015. APOBECs and virus restriction. *Virology*, 479-480, 131-45.
- Herrmann-Hoesing LM, 2010. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *J Vet Diagn Invest*, 22(6), 843-55.
- Herrmann-Hoesing LM, White SN, Lewis GS, Mousel MR, Knowles DP, 2007. Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin Vaccine Immunol*, 14(10), 1274-8.
- Houwers DJ, Konig CD, de Boer GF, Schaake J Jr, 1983. Maedi-visna control in sheep. I. Artificial rearing of colostrum-deprived lambs. *Vet Microbiol*, 8, 179-85.
- Houwers DJ, Schaake J Jr, de Boer GF, 1984. Maedi-visna control in sheep. II. Half-yearly serological testing with culling of positive ewes and progeny. *Vet Microbiol*, 9, 445-51.
- Hönger D, Leitold B, Schuller W, 1990. Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen das Maedi/Visna-Virus bei Schafen in Österreich (Serological studies of antibodies against maedi-visna virus in sheep in Austria). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, Feb 1,103(2), 39-41.
- Huttner K, Seelmann M, Feldhusen F, 2010. Prevalence and risk factors for Maedi-Visna in sheep farms in Mecklenburg-Western-Pomerania. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*, 123, 463-7.
- ICTV 2021. Genus: Lentivirus ICTV. Erişim adresi <https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae/lentivirus>. Erişim tarihi 21 Aralık 2022.
- Illius AW, Lievaart-Peterson K, McNeilly TN, Savill NJ, 2020. Epidemiology and control of maedi-visna virus: Curing the flock. *PLoS One*. 15, 9, e0238781.
- Junkuszew A, Dudko P, Bojar W, Olech M, Osiński Z, Gruszecki TM, Kania MG, Kuźmak J, Czerski G, 2016. Risk factors associated with small ruminant lentivirus infection in eastern Poland sheep flocks. *Prev Vet Med*, 127, 44-9.
- Kalogianni AI, Bossis I, Ekateriniadou LV, Gelasakis AI, 2020. Etiology, epizootiology and control of maedi-visna in dairy sheep: a review. *Animals*, 10(4), 616.
- Kampen AH, Tharaldsen J, Mork J, Grøneng G, 2008. Surveillance and Control Programmes for Terrestrial and Aquatic Animals in Norway. National Veterinary Institute, Oslo, Norway.
- Karanikolaou K, Angelopoulou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M, Papadopoulos O, Koptopoulos G, 2005. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin Res*, 58, 181-7.
- Karaoğlu T, Alkan F, Burgu İ, 2003. Küçük aile işletmelerindeki koyunlarda maedi-visna enfeksiyonunun seroprevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 123-6
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16,111-120.
- Kuhar U, Barlič-Maganja D, Grom J, 2013. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. *BMC Vet Res*, 3, 9, 172.
- Kuźmak J, Junkuszew A, Kozaczyńska B, Gruszecki TM, 2006. The relations between breed and age associated susceptibility/resistance of sheep infection with meadi visna virus (MVV). *Arch Tierz Dummerstorf*, 49, 160-5.
- Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ, 2012. The changing face of HIV vaccine research. *J Int AIDS Soc*, 15, e17407.
- Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profitti M, Rutili D, Rosati S, 2006. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol*, 112(3-4), 264-71.
- Lago N, López C, Panadero R, Cienfuegos J, Pato A, Prieto P, Díaz P, Mourazos N, Fernández G, 2012. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Prev Vet Med*, 103, 163-9.
- Leginagoikoa I, Juste RA, Barandika J, Amorena B, de Andres D, Lujan L, Badiola J, Berriatua E, 2006. Extensive rearing hinders Maedi-Visna Virus (MVV) infection in sheep. *Vet Res* 37, 767-78.

- Leginagoikoa I, Minguijón E, Berriatua E, Juste RA, 2009. Improvements in the detection of small ruminant lentivirus infection in the blood of sheep by PCR. *J Virol Methods*, 156, 145-9.
- Leginagoikoa I, Minguijón E, Juste RA, Barandika J, Amorena B, de Andrés D, Badiola JJ, Luján L, Berriatua E, 2010. Effects of housing on the incidence of visna/maedi virus infection in sheep flocks. *Res Vet Sci*, 88(3), 415-21.
- Leroux C, Cruz JC, Mornex JF, 2010. SRLVs: A genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Curr HIV Res*, 8, 94-100.
- L'Homme Y, Leboeuf A, Arsenault J, Fras M, 2015. Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). *Virology*, 15, 475, 159-71.
- López A, Martinson SA, 2017. Respiratory System, Mediastinum, and Pleurae, In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th ed, Zachary JF, Ed, Mosby, St. Louis, MO, USA, 471-560.
- Mahmood F, Khan A, Khan MZ, Hussain R, Gul ST, Siddique AB, 2012. Pathological and molecular based study of naturally occurring lentivirus infection. *Pak Vet J*, 32, 511-4.
- Mazarin V, Gourdou I, Querat G, Sauze N, Audoly G, Vitu C, Russo P, Rousselot C, Filippi P, Vigne R, 1990. Subcellular localization of rev-gene product in visna virus-infected cells. *Virology*, 178(1), 305-10.
- Mazzei M, Carrozza ML, Bandecchi P, Mazzanti G, Mannelli A, Tolari F, 2005. Evaluation of an ELISA to detect antibodies to maedi-visna virus in individual and pooled samples of milk from sheep. *Vet Rec*, 29, 157(18), 552-5.
- McNeilly TN, Baker A, Brown JK, Collie D, Maclachlan G, Rhind SM, Harkiss GD, 2008. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of visna/maedi virus. *J Virol*, 82(3), 1526-36.
- McNeilly TN, Tennant P, Luján L, Pérez M, Harkiss GD, 2007. Differential infection efficiencies of peripheral lung and tracheal tissues in sheep infected with Visna/maedi virus via the respiratory tract. *J Gen Virol*, 88, 2, 670-679.
- Mendiola WPS, Tórtora JL, Martínez HA, García MM, Cuevas-Romero S, Cerriteño JL, Ramírez H, 2019. Genotyping Based on the LTR Region of Small Ruminant Lentiviruses from Naturally Infected Sheep and Goats from Mexico. *BioMed Research International*, 1-8.
- Michiels R, Adjadj NR, De Regge N, 2020. Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains. *Pathogens*, 9, 183.
- Michiels R, Van Mael E, Quinet C, Adjadj NR, Cay AB, De Regge N, 2018. Comparative Analysis of Different Serological and Molecular Tests for the Detection of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) in Belgian Sheep and Goats. *Viruses*, 8, 10(12), 696.
- Minardi da Cruz JC, Singh DK, Lamara A, Chebloune Y, 2013. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. *Viruses*, 23,5(7), 1867-84.
- Minguijón E, Reina R, Pérez M, Polledo L, Villoria M, Ramírez H, Leginagoikoa I, Badiola JJ, García-Marín JF, de Andrés D, Luján L, Amorena B, Juste RA, 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol*, 14, 181(1-2), 75-89.
- Molae V, Bazzucchi M, De Mia GM, Otard V, Abdollahi D, Rosati S, Lühken G, 2020. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep. *Sci Rep*, 10, 2243.
- Mordasini F, Vogt HR, Zahno ML, Maeschli A, Nenci C, Zanoni R, Peterhans E, Berton G, 2006. Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol*, 44(3), 981-91.
- Morris ST, 2017. Overview of sheep production systems. In *Advances in sheep welfare*. Woodhead Publishing, 19-35.
- Mosa AH, Zenad MM, 2020. First Molecular Detection of Maedi-Visna Virus in Awassi Sheep of Middle Iraq Regions. *Bulg J Vet Med*, 25, 2
- Muz D, Oğuzoğlu TC, Rosati S, Reina R, Bertolotti L, Burgu I, 2013. First molecular characterization of visna/maedi viruses from naturally infected sheep in Turkey. *Arch Virol*, 158(3), 559-70.

- Narayan O, Cork LC, 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev Infect Dis*, 7(1), 89-98.
- Norouzi B, Taghavi Razavizadeh A, Azizzadeh M, Mayameei A, Najar Nezhad Mashhadi V, 2015. Serological study of small ruminant lentiviruses in sheep population of Khorasan-e-Razavi province in Iran. *Vet Res Forum*, 6(3), 245-9.
- Ogden N, Davies P, Lovatt F, 2019. Dealing with maedi visna in UK sheep flocks. *In Practice*, 41(7), 321-8.
- OIE, 2018. Caprine arthritis/encephalitis and Maedi-visna. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)*. World Organization for Animal Health, Paris, France, 1420-9.
- Olech M, Kuźmak J, Kycko A, Junkuszew A, 2022. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses originating from naturally infected sheep and goats from Poland based on the long terminal repeat sequences. *J Vet Res*, 15, 66(4), 497-510.
- Olech M, Valas S, Kuźmak J, 2018. Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses. *PLoS One*, 5, 13(3), e0193892.
- Olech M, Rachid A, Croisé B, Kuźmak J, Valas S, 2012. Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland. *Virus Res*, 163(2), 528-36.
- Olender S, Wilkin TJ, Taylor BS, Hammer SM, 2012. Advances in antiretroviral therapy. *Top Antivir Med*, 20, 61-86.
- Oskarsson T, Hreggvidsdottir HS, Agnarsdottir G, Matthiasdottir S, Ogmundsdottir MH, Jonsson SR, Georgsson G, Ingvarsson S, Andresson OS, Andresdottir V, 2007. Duplicated sequence motif in the long terminal repeat of maedi-visna virus extends cell tropism and is associated with neurovirulence. *J Virol* 81, 4052-57.
- Ostuni A, Monné M, Crudele MA, Cristinziano PL, Cecchini S, Amati M, De Vendel J, Raimondi P, Chassalevris T, Dovas CI, Bavoso A, 2021. Design and structural bioinformatic analysis of polypeptide antigens useful for the SRLV serodiagnosis. *J Virol Methods*, 297, 114266.
- Pépin M, Vitu C, Russo P, Mornex JF, Peterhans E, 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet Res*, 29(3-4), 341-67.
- Pérez M, Biescas E, Reina R, Glaria I, Marín B, Marquina A, Salazar E, Álvarez N, de Andrés D, Fantova E, Badiola JJ, Amorena B, Luján L, 2015. Small ruminant lentivirus-induced arthritis: clinicopathologic findings in sheep infected by a highly replicative SRLV B2 genotype. *Vet Pathol*, 52(1), 132-9.
- Pérez M, Muñoz JA, Biescas E, Salazar E, Bolea R, de Andrés D, Amorena B, Badiola JJ, Reina R, Luján L, 2013. Successful Visna/maedi control in a highly infected ovine dairy flock using serologic segregation and management strategies. *Prev Vet Med*, 112(3-4), 423-7.
- Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliasiewicz M, Juste RA, Krassnig R, Lafont JP, Lenihan P, Pétursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex JF, Pépin M, 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res*, 35(3), 257-74.
- 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*, 1, 69(4), 433-42.
- Picotto LD, Fuentealba NA, Bertoni G, Patrucco M, Sguazza GH, Echeverria MG, Panei CJ, 2021. Argentinian small ruminant lentivirus (SRLV) p55gag antigen fused to maltose binding protein to use in SRLV serological confirmatory diagnosis. *Virus Res*, 15, 296, 198332.
- Preziuso S, Or ME, Giammarioli M, Kayar A, Feliziani F, Gönül R, Farneti S, Yaramış ÇP, Valente C, Cuteri V, 2010. Maedi-visna virus in Turkish sheep: a preliminary serological survey using ELISA tests. *Turk J Vet Anim Sci*, 343, 289-93.
- Preziuso S, Renzoni G, Allen TE, Taccini E, Rossi G, DeMartini JC, Braca G, 2004. Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet Microbiol*, 9, 104(3-4), 157-64.

- Prezioso S, Taccini E, Rossi G, Renzoni G, Braca G, 2003. Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Eur J Histochem*, 47, 4, 373-8.
- Pulina G, Milán M, Lavín M, Theodoridis A, Morin E, Capote J, Thomas D, Francesconi A, Caja G, 2018. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J Dairy Sci*, 101, 6715-29.
- Ramírez H, Reina R, Amorena B, de Andrés D, Martínez HA, 2013. Small ruminant lentiviruses: genetic variability, tropism and diagnosis. *Viruses*, 23, 5(4), 1175-207.
- Reina R, Berriatua E, Lujan L, Juste R, Sanchez A, de Andres D, Amorena B, 2009. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *Vet J*, 182, 31-7.
- Reina R, Bertolotti L, Dei Giudici S, Puggioni G, Ponti N, Profiti M, Patta C, Rosati S, 2010. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol*, 144(1-2), 24-31.
- Reina R, de Andrés D, Amorena B, 2013. Immunization against Small Ruminant Lentiviruses. *Viruses*, 5, 1948-63.
- Reina R, Grego E, Bertolotti L, De Meneghi D, Rosati S, 2009. Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *J Virol*, 83(2), 1152-5.
- Reina R, Mora M, Glaria I, García I, Solano C, Luján L, Badiola J, Contreras A, Berriatua E, Juste R, 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res*, 121, 189-98.
- Ritchie C, Davies I, Smith R, 2012. Maedi Visna Seroprevalence Survey 2010. Erişim adresi https://meatpromotion.wales/images/resources/Funding_bodies_report_MV_seroprevalence_survey_2010_final_version_14.6.12.pdf. Erişim tarihi 21 Aralık 2022.
- Romani B, Cohen EA, 2012. Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr Opin Virol*, 2(6), 755-63.
- Ryan S, Tiley L, McConnell I, Blacklaws B, 2000. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *J Virol*, 74, 10096-103.
- Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R, Clements JE, 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, 179(1), 347-64.
- 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.
- Savic S, Žekić Stošić M, Bugarski D, Marčić D, Milovanović A, Potkonjak A, 2020. Prevalence of Small Ruminant Lentivirus Infections In Sheep and Goats in Some Regions of Vojvodina Province. *Arch Vet Med*, 13, 29-40.
- Schaller P, Vogt HR, Strasser M, Nettleton PF, Peterhans E, Zanoni R, 2000. Seroprevalence of Maedi-Visna and Border Disease in Switzerland. *Bord Dis Switz*, 142, 145-53.
- Shah C, Böni J, Huder JB, Vogt HR, Mühlherr J, Zanoni R, Miserez R, Lutz H, Schüpbach J, 2004. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, 319, 12-26.
- Sigurdsson B, Grimsson H, Pálsson PA, 1952. Maedi, a chronic, progressive infection of sheep's lungs. *J Infect Dis*, 90(3), 233-41.
- Sigurdsson B, Pálsson PA, Grimsson H, 1957. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J Neuropathol Exp Neurol*, 16(3), 389-403.
- Sigurdsson B, Thormar H Pálsson PA, 1960. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv f Virusforschung*, 10, 368-81.
- Sigurdsson, B, 1954. Mædi, A Slow Progressive Pneumonia of Sheep: An Epizootological and a Pathological Study. *Br Vet J*, 110(7), 255-70.

- Sihvonen L, Nuotio L, Rikula U, Hirvelä-Koski V, Kokkonen UM, 2000. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev Vet Med*, 47, 213-20.
- Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, Retzel E, Tiollais P, Haase A, Wain-Hobson S, 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, 42(1), 369-82.
- Souza TS, Pinheiro RR, Costa JN, Lima CC, Andrioli A, Azevedo DA, Santos VW, Araujo JF, Sousa AL, Pinheiro DN, 2015. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Braz J Microbiol*, 46, 867-74.
- Spickler A, 2015. Small Ruminant Lentiviruses: Maedi-Visna & caprine arthritis and encephalitis. The Center for Food Security & Public Health Iowa State University, 1-8.
- Stonos N, Wootton SK, Karrow N, 2014. Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. *Viruses*, 6, 3311-33.
- Straub OC, 2004. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(1), 1-5.
- Sutton KA, Lin CT, Harkiss GD, McConnell I, Sargan DR, 1997. Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Virology*, 3, 229(1), 240-50.
- Suzuki K, Oguma K, Sentsui H, 2017. Preparation of a cell line persistently infected with maedi/visna virus and production of viral antigens. *J Vet Med Sci*, 20, 79(1), 141-3.
- Synge BA, Ritchie CM, 2010. Elimination of small ruminant lentivirus infection from sheep flocks and goat herds aided by health schemes in Great Britain. *Vet Rec*, 167, 739-43.
- Tamura K, Stecher G, and Kumar S, 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tan MT, Alkan F, 2002. Türkiye'de maedi-visna enfeksiyonunun seroepidemiolojisi ve virus izolasyonu. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 49(1), 45-50.
- Teles JAA, Nascimento SA, Melo EX, Almeida EC, Marvulo MFV, Rizzo H, Nogueira DB, de Azevedo SS, Silva JCR, Castro RS, 2023. Factors associated with small ruminant lentivirus infection in goat herds from Pernambuco state, Northeast region of Brazil. *Prev Vet Med*, 211, 105814.
- Toft N, Akerstedt J, Tharaldsen J, Hopp P, 2007. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet Microbiol*, 25, 120(1-2), 77-86.
- Tolari F, Al-Ramadneh W, Mazzei M, Carrozza ML, Forzan M, Bandecchi P, Grego E, Rosati S 2013. Small ruminant lentiviruses in Jordan: Evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens. *Trop Anim Health Prod*, 45, 1335-40.
- Torsteinsdóttir S, Matthíasdóttir S, Vidarsdóttir N, Svansson V, Pétursson G, 2003. Intratracheal inoculation as an efficient route of experimental infection with maedi-visna virus. *Res Vet Sci*. 75(3), 245-7.
- Torsteinsdóttir, S, Andresdóttir, V, Arnarson, H, Petursson, G, 2007. Immune response to maedi-visna virus. *Front Biosci*, 12, 1532-43.
- Trezeguet MÁ, Suárez MF, Barral LE, Periolo F, Maidana CE, Farías PC, Rodríguez CE, Teresa R, 2013. Situación epidemiológica de maedi-visna y artritis encefalitis caprina en la Argentina. *Sitio Argent Prod Anim*, 1, 1-11.
- Tumino S, Tolone M, Galluzzo P, Migliore S, Sechi T, Bordonaro S, Puleio R, Carta A, Loria GR, 2022. Alternative Molecular Tools for the Fight against Infectious Diseases of Small Ruminants: Native Sicilian Sheep Breeds and Maedi-Visna Genetic Susceptibility. *Animals*, 12(13), 1630.
- Ün H, Özgünlük İ, Çabalar M, 2018. Şanlıurfa yöresinde Maedi-Visna Virus (MVV) enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 7(2), 144-8.
- Varea R, Monleón E, Pacheco C, Luján L, Bolea R, Vargas MA, Van Eynde G, Saman E, Dickson L, Harkiss G, Amorena B, Badiola JJ, 2001. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest*, 13(4), 301-7.

- Velez DR, White BC, Motsinger AA, Bush WS, Ritchie MD, Williams SM, Moore JH, 2007. A balanced accuracy function for epistasis modeling in imbalanced datasets using multifactor dimensionality reduction. *Genet Epidemiol*, 31, 306-15.
- Ven S, Rani A, 2012. Discriminatory Power of Agarose Gel Electrophoresis in DNA Fragments Analysis. *Gel electrophoresis-principles and basics*, 41-56.
- Vidić B, Grgić Živoslav, Sav-Jevđenić S, Maljković M, Milanov D, 2008. Prevalence of Maedi-Visna in Sheep Herds. *AVM*, 1(1), 32-42.
- Villet S, Bouzar BA, Morin T, Verdier G, Legras C, Chebloune Y, 2003. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *J Virol*, 77(17), 9632-8.
- Villoria M, Leginagoikoa I, Luján L, Pérez M, Salazar E, Berriatua E, Juste RA, Minguijón E, 2013. Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Rumin Res*, 110, 2-3, 155-60.
- Vinha KT, da Silva TIB, 2020. Seropositivity for Maedi-Visna virus in sheep in Porto Acre city, Western Amazon, Brazil. *Ciênc. Anim Bras*, 21, e59173.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K, 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, 6(11), 3543-57.
- Wang DF, Yang XY, Wei YR, Li JJ, Bolati H, Meng XX, Tuerxun G, Nuerdan N, Wu JY, 2022. Genome characterization of the Caprine arthritis-encephalitis virus in China: A retrospective genomic analysis of the earliest Chinese isolates. *J Integr Agric*, 22(3), 872-80.
- White SN, Knowles DP, 2013. Expanding Possibilities for Intervention against Small Ruminant Lentiviruses through Genetic Marker-Assisted Selective Breeding. *Viruses*, 5, 1466-99.
- Wolf C, 2021. Update on Small Ruminant Lentiviruses. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 1, 199-208.
- Yaman Y, Keles M, Aymaz R, Sevim S, Sezenler T, Onaldi AT, Kaptan C, Baskurt A, Koncagül S, Öner Y, Öztürk EE, İriadam M, Ün C, Heaton MP, 2019. Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep. *Small Rumin Res*, 177, 61-7.
- Yang R, Murphy C, Song Y, Ng-Hublin J, Estcourt A, Hijjawi N, Chalmers R, Hadfield S, Bath A, Gordon C, Ryan U, 2013. Specific and quantitative detection and identification of *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* in clinical and environmental samples. *Exp Parasitol*, 135(1), 142-7.
- Yavru S, Şimşek A, Bulut O, Kale M, 2012. Konya bölgesi koyunlarında Maedi-Visna Virus enfeksiyonu üzerine serolojik araştırma. *Eurasian J Vet Sci*, 28, 3, 142-8.
- Zahno ML, Bertoni G, 2018. An Immunodominant Region of the Envelope Glycoprotein of Small Ruminant Lentiviruses May Function as Decoy Antigen. *Viruses*, 2, 10(5), 231.
- Zhang J, Wu J, Wang W, Wu H, Yu B, Wang J, Lv M, Wang X, Zhang H, Kong W, Yu X, 2014. Role of cullin-elonginB-elonginC E3 complex in bovine immunodeficiency virus and maedi-visna virus Vif-mediated degradation of host A3Z2-Z3 proteins. *Retrovirology*, 12, 11, 77.
- Zhang K, He J, Liu Y, Shang Y, Liu X, 2013. A seroprevalence survey of Maedi-Visna among twenty-four ovine flocks from twelve regions of China. *J Integr Agric*, 12, 2321-3.

MARMARA BÖLGESİNDE
KOYUNLARDA SMALL
RUMİNANT LENTİVİRUS
ENFEKSİYONUNUN
MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Yazar Mustafa Türkdogan

Gönderim Tarihi: 22-Haz-2023 09:57AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2120753862
Dosya adı: 21062023_TEZ_Turnitin_MT-QA.docx (3.33M)
Kelime sayısı: 15473
Karakter sayısı: 101617

MARMARA BÖLGESİNDE KOYUNLARDA SMALL RUMİNANT LENTİVİRUS ENFEKSİYONUNUN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLIK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

2

dspace.ankara.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

3

Submitted to Selçuk Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

4

acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

5

shop.indical.com

İnternet Kaynağı

<%1

6

Eda Altan, Satya Parida, Mana Mahapatra, Nuri Turan, Yılmaz Huseyin. "Molecular characterization of Peste des petits ruminants viruses in the Marmara Region of Turkey", Transboundary and Emerging Diseases, 2018
Yayın

<%1

7

Submitted to Afyon Kocatepe University

Öğrenci Ödevi

<%1