



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**EVCİL KÖPEKLERDE
CANINE CORONAVİRUSLARIN (CCoV)
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

Ayşegül KUDU

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU**

2015 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EVCİL KÖPEKLERDE
CANINE CORONAVIRUSLARIN (CCoV)
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

Ayşegül KUDU

**VİROLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU**

2015 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Viroloji Doktora Programı

çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

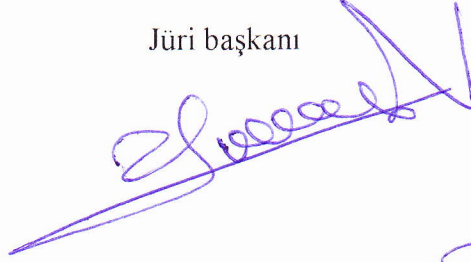
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 04 / 2015

Prof. Dr. Yılmaz AKÇA

Ankara Üniversitesi

Jüri başkanı



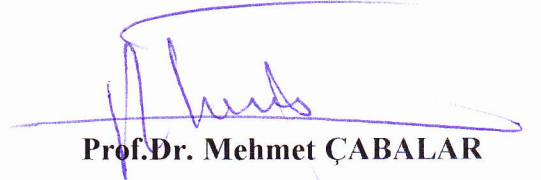
Prof. Dr. Hakan YARDIMCI

Ankara Üniversitesi



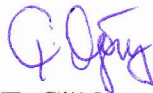
Prof.Dr. Mehmet ÇABALAR

Harran Üniversitesi



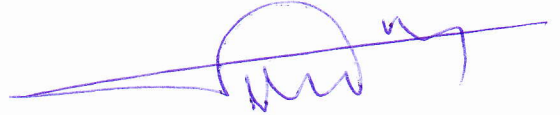
Prof. Dr. T. Çiğdem OĞUZOĞLU

Ankara Üniversitesi



Doç.Dr. V.Soydal ATASEVEN

Mustafa Kemal Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	2
1.1.1. Virusun Yapısı	9
1.1.1.1. Virusun Viral Proteinleri	9
1.1.1.1.1. Spike Proteini (S)	10
1.1.1.1.2. Membran Glikoproteini (M)	15
1.1.1.1.3. Zarf Glikoproteini (E)	17
1.1.1.1.4. Nükleokapsid Fosfoproteini (N)	18
1.1.1.1.5. Hemagglutinin-Esteraz Glikoproteini (HE)	19
1.1.1.1.6. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP)	21
1.1.2. Virusun Replikasyonu	22
1.1.3. Canine Coronavirusun Türlerle Göre Dağılımı	24
1.2. Klinik Bulgular ve Patogenez	25
1.3. Epidemiyoloji	25
1.4. Evrimsel Değişiklikler	26
1.5. İmmunoloji	30
1.6. CCoV Enfeksiyonunun Tanısı	30
1.6.1. Direkt Tanı	31
1.6.1.1. Virusun İzolasyonu ve Elektron Mikroskopi	32
1.6.1.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler	32
1.6.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Dizin Analizi	32
1.6.2. Serolojik Tanı	32

2. GEREÇ ve YÖNTEM	34
2.1. Gereç	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	35
2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması	35
2.2.1.2. Rektal Sürüntü Örneklerinin Hazırlanması	35
2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu	36
2.2.3. Viral RNA'nın Reverz Transkripsiyonu (RT)	36
2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	38
2.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi	40
2.2.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	40
2.2.7. Dizin Analizi	41
2.2.7.1. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
2.2.7.2. Filogenetik Analiz	43
2.2.7.3. İstatistiksel Yöntemler	43
3. BULGULAR	44
3.1. RT-PCR Sonuçları ve Bireysel Verilerin Değerlendirilmesi	46
3.2. Dizin Analizi Sonuçları ve Filogenetik Değerlendirme	47
3.2.1. M Gen Bölgesine Göre Değerlendirme	49
3.2.2. S Gen Bölgesine Göre Değerlendirme	55
3.2.2.1. UCD1 Primerleri Kullanılarak Yapılan Değerlendirme	55
3.2.2.2. S5-S6 Primerleri Kullanılarak Yapılan Değerlendirme	61
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	76
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	90
ÖZGEÇMİŞ	98

ÖNSÖZ

İnsanların en yakın dostu olan ve ilk evcilleştirilen hayvanlar arasında yer alan köpekler; iz sürme, koruma, avcılık, savaş aracı olma gibi özelliklerinden de faydalanan hayvanlardandır. Evcil hayvanların toplumda giderek artan önemi ile günümüzde birçok köpek ırkının yetiştiriciliği yapılır hale gelmiş, bu durum pet klinisyenliği alanında yeni sorunların oluşması ile sonuçlanmıştır. Hiç şüphesizdir ki; global anlamda önemli ve dünyada yaygın Canine Corona Viruslar (CCoV), köpeklerde primer enteritis ajanları arasında sayılmaktadır. Özellikle pantropik olarak adlandırılan CCoV suşları, ishale karakterize enfeksiyonlara yol açması yanı sıra multisistemik enfeksiyonlara ve mikrobiyel diğer ajanların da eklenmesiyle ölümle sonuçlanan ağır tablolara neden olmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde varlığı bildirilen CCoV enfeksiyonunun, Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tekniği kullanılarak yapılan tanısını takiben, pozitif olanlar arasından seçilen örneklerdeki CoV tiplerinin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup, 2012-2013 yılları arasında ülkemizde sirküle olan “canine” kökenli CoV’ların dünyadaki hem cinsleri ve aşı suşları ile benzerlik ve farklılıklarının ayrımı değerlendirilmiştir. Ayrıca; elde edilen örneklerde yapılan istatistiki analiz ile yaş, cinsiyet, sağlık durumu, yaşam koşulları ve besleme koşullarının CCoV enfeksiyonuna yatkınlık konusundaki ilişkisi de sorgulanmıştır.

Gerek tüm doktora eğitimim süresince, gerekse çalışmanın yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr.T.Çiğdem OĞUZOĞLU’na, Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Yılmaz AKÇA’ya; Sayın Prof.Dr.İbrahim BURGU’ya, Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr.Feray ALKAN, Prof. Dr. Aykut ÖZKUL, Prof. Dr. Seval BİLGE DAĞALP, Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU ve tez izleme komitesi üyesi Prof. Dr. Hakan YARDIMCI’ya, tez çalışmam boyunca laboratuvarında desteklerini gördüğüm tüm doktora öğrencisi ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Dr.Hümay AKIN İLERİ’ye, istatistiksel verilerin analizi ve tüm yardımları için Araş.Gör.Dr.Doğukan ÖZEN’e, destekleri için Dr.Ünal PARLAK, Uzm.Vet.Hek.Fuat ÖZYÖRÜK ve Doç.Dr.Veli GÜLYAZ’a, her zaman yanımda olan ve destekleyen Araş.Gör.Dr. Kübra KARAKAŞ’a ve tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora çalışmam süresince de sabır ve sevgi ile beni destekleyen, önüme çıkan zorluklar karşısında güçlü durmamı sağlayan, bana olan güven ve inançlarını kaybetmeyen, her zaman yanımda olan, babam ve annem başta olmak üzere tüm aileme ve varlıklarıyla bile beni mutlu eden yeğenlerime sonsuz şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aa	: Aminoasit
APN	: Aminopeptidaz N
Bç	: Baz çifti
C	: Celcius
CAV	: Canine Adenovirus
CCoV	: Canine Coronavirus
cDNA	: Komplementer DNA
CDV	: Canine Distemper Virus
CoV	: Coronavirus
CPV	: Canine Parvovirus
CRCoV	: Canine Respiratorik Coronavirus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
DTCS	: Dye Termination Cycle Sequencing
EDTA	: Ethylene diamine tetra-acetic asit
FCoV	: Feline Coronavirus
GiCoV	: Giraffe Coronavirus
Gp	: Glikoprotein
HE	: Hemagglütinin Esteraz
HEV	: Hemagglutinating encephalomyelitis virus
IBV	: Infectious bronchitis virus
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
Ig	: İmmunglobulin
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
M	: Matrix
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MHV	: Mouse Hepatitis Virus
ml	: Mililitre

MLV	: Modifiye-canlı virus aşısı
mRNA	: Mesajcı RNA
NCBI	: National Center Biotechnology Information
ORF	: Open Reading Frame
PBS	: Fosfat Tampon Tuz Solusyonu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PH	: Power of Hydrogen
Pmol	: Pikomol
Pp	: Polipeptid
RdRp	: RNA bağımlı RNA polimeraz
RNA	: Ribonükleik asit
RNAase	: Ribonükleaz
Rnp	: Ribonükleoprotein
Rpm	: Revolutions per minute
RT-PCR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Spike
SARS	: Severe acute respiratory syndrome
sM	: Small membran
TAE	: Tris Asetat Ethylene
TGEV	: Transmissible Gastroenteritis Coronavirus
U	: Ünite
UTR	: Untranslated Region
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Coronavirusların türlere göre dağılımı	4
Şekil 1.2. CCoV ve FCoV genomlarının genetik farklılıklarının şeması	6
Şekil 1.3. Coronavirus spike proteini bağlanma bölgeleri ve CCoV'nin filogenideki yeri	9
Şekil 1.4. Kedi (FCoV), köpek (CCoV) ve domuzların (TGEV) S glikoproteinlerinin dizin karşılaştırmaları	14
Şekil 1.5. CoV proteinlerinin yakın görünümü	16
Şekil 1.6. CoV proteinleri	18
Şekil 1.7. Coronavirusların yapısal olmayan proteinlerinin şematik gösterimi	21
Şekil 1.8. CCoV tip 1 ve tip 2'nin Pol geninin şematik gösterimi	22
Şekil 1.9. Coronavirusların replikasyonu	23
Şekil 2.1. Kullanılan primerlerin gen üzerindeki yerleri	39
Şekil 3.1. CCoV M gen bölgesine ait agar jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 3.2. CCoV S gen bölgesine (UCD1 F-R primerleri ile) ait agar jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 3.3. CCoV S gen bölgesine (S5-S6 primerleri ile) ait agar jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 3.4. M gen bölgesi yönünden nükleik asit "percent identity-divergence" tablosu	51
Şekil 3.5. M gen bölgesine yönelik 'neighbour-joining' analizi	52
Şekil 3.6. M gen bölgesine yönelik protein hizalamaları	53
Şekil 3.7. S gen bölgesi (UCD1 F-R) yönünden nükleik asit "percent identity-divergence" tablosu	57
Şekil 3.8. S gen bölgesine yönelik (UCD1 F-R primerleri ile) 'neighbour-joining' analizi	58
Şekil 3.9. S gen bölgesine yönelik (UCD1 F-R primerleri ile) protein hizalamaları	59
Şekil 3.10. S gen bölgesi (S5-S6) yönünden nükleik asit "percent identity-divergence" tablosu	62
Şekil 3.11. S gen bölgesine yönelik (S5-S6 primerleri ile) 'neighbour-joining' analizi	64
Şekil 3.12. S gen bölgesine yönelik (S 5-S6 primerleri ile) protein hizalamaları	65

ÇİZELGE

Çizelge 1.1. Coronavirusların sınıflandırılması ve konakçıları	3
Çizelge 1.2. Coronavirus yapısal proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları	19
Çizelge 1.3. Coronavirus'ların Primer Bağlanma Faktörleri ve Reseptörleri	24
Çizelge 2.1. RT reaksiyonu bileşenleri	37
Çizelge 2.2. RT reaksiyonu ısı döngüleri	37
Çizelge 2.3. Kullanılan primer dizinleri	38
Çizelge 2.4. PCR reaksiyonu bileşenleri	39
Çizelge 2.5. DTCS bileşenleri	42
Çizelge 2.6. DNA dizi analizi reaksiyonu bileşenleri ve ısı döngüsü	42
Çizelge 3.1. M ve S gen bölgelerine yönünden örneklerin RT-PCR sonuçları	44
Çizelge 3.2. RT-PCR sonuçlarının bireysel verilere göre dağılımı	47
Çizelge 3.3. M ve S gen bölgelerine göre RT-PCR sonuçları ve örneklerin CCoV tipleri	49
Çizelge 3.4. S gen bölgesindeki aminoasit değişimleri	55

1. GİRİŞ

Viroloji alanında yaşanan teknolojik gelişimler ışığında canine kökenli birçok viral enfeksiyöz ajan tanımlanmıştır. Bunlar arasında, ilk kez Almanya'da çoban köpeklerinde ortaya çıkan salgında bildirilen *Coronaviridae* ailesine ait Canine Coronavirus (CCoV), köpeklerde enteritise neden olan çok sayıda viral etkenden biri olmakla birlikte, Canine Parvovirus (CPV) ve Canine Distemper Virus (CDV) gibi, tüm dünyada köpeklerde yaygın enfeksiyonlara neden enteroviraller arasında sayılmaktadır.

CCoV ilk tanımlanmasından itibaren 43 yıl geçmesine rağmen, veteriner hekimliği alanında hala önemli bir enfeksiyon olarak varlığını sürdürmektedir. Hafif enteritisle başlayan viral enfeksiyona diğer patojen etkenlerin eşlik etmesiyle ağırlaşan klinik tablo, mutant/virulent suşlar ile birlikte (***pantropik canine coronavirus***) farklı organlara yayılarak ölümle sonuçlanabilmektedir.

CCoV, Türkiye'de yaygın olarak gözlenmesine rağmen (Atasevan ve ark., 2005, Gür ve ark., 2007, Gür ve ark., 2008, Yeşibağ ve ark., 2004), dizin analizine dayalı moleküler karakterizasyon çalışmaları bugüne kadar literatürde yer almamış olup, moleküler epidemiyolojik verilere dayalı bulguları içeren bu tez ile bu konudaki ihtiyaca ışık tutucu ilk bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.

Günümüzde; ülkemizde ve dünyada CCoV enfeksiyonundan korunmak amacıyla gerçekleştirilen aşı programlarında çeşitli inaktif ve modifiye canlı aşılarla yer verilmektedir (Pratelli ve ark., 2003b). Mevcut aşıların güvenli olduğu, bağırsak sistemindeki CCoV replikasyonunu zayıflattığı bildirilmiştir (Greene ve ark., 2012). Ancak aşılar genel olarak,

klasik CCoV (CCoV tip 2a) tipleri baz alınarak hazırlandığından, CCoV tip 1'e karşı bu aşılarda yeterli koruma sağlaması mümkün olamamaktadır (Licitra ve ark., 2014). Ayrıca CCoV tip 2'nin varyant suşlarına karşı da bu aşılarda yeterli korumayı sağlayıp sağlayamadığı konusu hala belirsizliğini sürdürmektedir (Licitra ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmada;

- CCoV enfeksiyonunun genomik yapıdaki M ve S genleri yönünden RT-PCR ile tanısı,

- Örneklenen hayvanların CCoV enfeksiyonu yönünden; yaş, cinsiyet, aşı durumu (aşılı/aşısız), sağlık durumu (klinik bulgulu/sağlıklı görünümü), yaşam koşulları (içerde/dışarıda bakım) ve besleme (tekli/çoklu) koşullarının istatistiksel analizi,

- CCoV pozitif tespit edilen suşların M ve S genleri yönünden dizin analizleri,

- CCoV pozitif tespit edilen örneklerin moleküler karakterizasyonu ve dünyadaki hem cinsleri ile benzerlik/farklılıklarının filogenetik analizi,

- Ülkemizde 2012-2013 yıllarında sirküle olan CCoV suşlarının, uygulanan aşı suşları ile genetik yakınlığının araştırılması vasıtasıyla bu aşılarda kullanılabilirliğinin sorgulanması hedeflenmiştir.

1.1. Etiyoloji

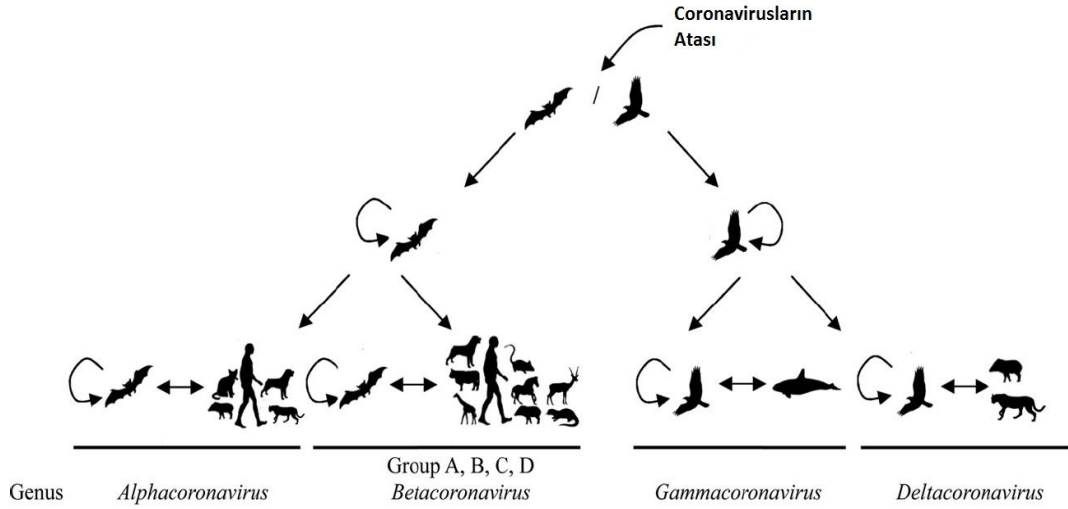
Coronavirus genusu, *Nidovirales* takımında yer alan *Coronaviridae* ailesinde bulunan bir genustur. Nükleik asit olarak RNA içeren bu virüsler, çeşitli hayvan türleri ve insanlardan izole edilmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Coronavirusların sınıflandırılması ve konakçıları

<i>-Nidovirales</i>	
<i>+Arteriviridae</i>	
<i>+Coronaviridae</i>	
<i>Coronavirinae</i>	
<i>Alfacoronavirus</i>	Yarasa, kedi, köpek, insan, tavşan, domuz
<i>Betacoronavirus</i>	Yarasa, sığır, köpek, at, insan, fare, sıçan
<i>Gamacoronavirus</i>	Kanatlılar, balina
<i>Deltacoronavirus</i>	Kanatlılar
<i>+Torovirinae</i>	
<i>+Mesoniviridae</i>	
<i>+Roniviridae</i>	

Coronaviruslar immunolojik karakterlerine göre önceleri üç grupta sınıflandırılmış, daha sonraları üç yeni kanatlı virüsü belirlenmiş ve bu sayı dörde yükselmiştir (Gonzalez ve ark., 2003; Woo ve ark., 2010) (Şekil 1.1). ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) tarafından 2013 yılında yapılan virus sınıflandırmasına göre coronaviruslar 4 grupta klasifiye edilmiştir: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* ve *Deltacoronaviruslar*.

Coronavirus'lar (CoV), dünya çapında birçok türde yaygın olarak bulunur. Memeli ve kanatlılarda sıklıkla görülen bu virus, respiratorik ve enterik hastalıklara sebep olmaktadır. CoV ile ilgili ilk bilgiler, 1937'de Beaudette ve Hudson tarafından, tavuklardan İnfeksiyöz Bronşit Virus (IBV) (Beaudette ve Hudson, 1937); 1940'larda Fare Hepatit Virus (MHV) (Cheever ve ark., 1949) ve domuzlardan Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) (Doyle ve Hutchings 1946) izolasyonuna dayanmaktadır.

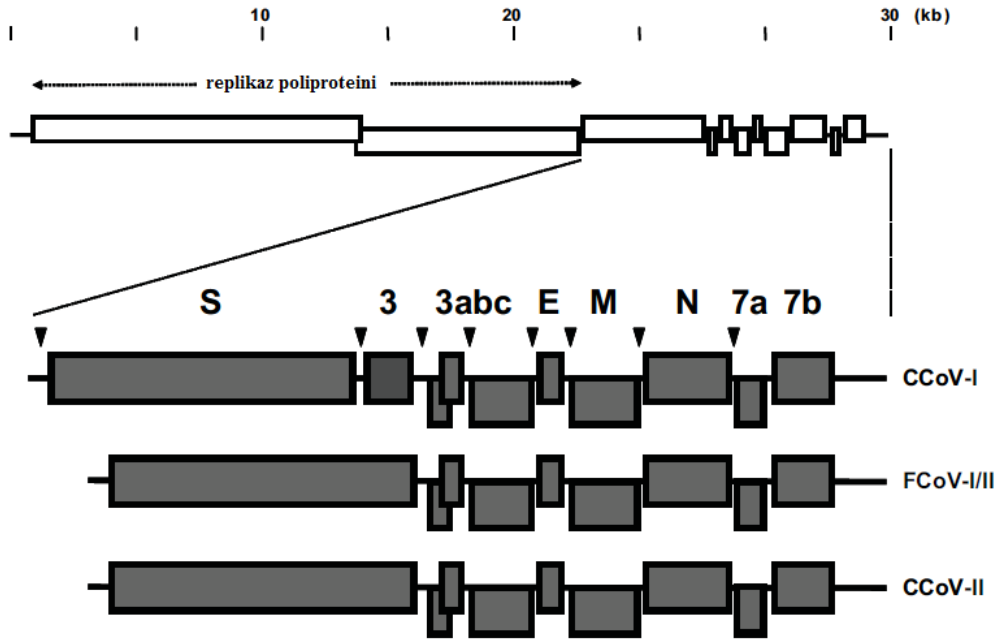


Şekil 1.1. Coronavirusların türlere göre dağılımı (Woo ve ark., 2010)

Coronavirusların biyoçeşitliliği ve genomu üzerine yapılan çalışmalarda 2003 yılından önce yalnızca 10 adet coronavirusun tam genom analizi bilgilerine ulaşılabilirken, SARS enfeksiyonunun tanımlanmasından sonra bu sayı giderek artmıştır (Drosten ve ark., 2003). Bu tam genom analizlerinden ikisi insan, 10 tanesi diğer memeli coronavirusları ve 4 tanesi de kanatlı coronaviruslarına aittir. Bu bilgiler ışığında grup 2 ve grup 3 coronaviruslarda ikişer yeni subgroup (2c, 2d ve 3b, 3c) önerilmiştir (Woo ve ark., 2009).

RdRp (RNA bağımlı RNA polimeraz)'ye bağlı olarak, yüksek sıklıkta RNA rekombinasyonu ve coronavirusların büyük genoma sahip olması sonucunda coronaviruslar oldukça çeşitlidir. Bütün konakçılar arasında coronaviruslardaki en fazla çeşitlilik kuşlar ve yarasalarda olmuştur. Bunun sebebi olarak, kendi tür çeşitlilikleri, uçabilme yetenekleri, çevresel koşullar sayılabilir. Coronavirusların sayılarının artmasıyla birlikte, birbirine uzaktan ilişkili olan hayvanların oldukça yakın ilişkili olan coronavirusları olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun türler arası geçiş sonucu olduğu düşünülmektedir (Woo ve ark., 2009).

Bütün enterik CCoV'ler (kedi, domuz ve dağ gelinciği ile ilişkili olanlar dahil) taksonomik bakış açısından aynı soydan gelmekte ve *Alfacoronavirus-1* adını almaktadırlar. CCoV'ler tip 1 ve 2 olmak üzere ikiye ayrılır. Köpeklerden izole edilen CCoV suşlarının bazıları, yapılan genetik araştırmalarda sirküle olan FCoV suşlarına (FCoV tip 1) yakın bulunduklarından; bu tipteki viruslar "Feline corona-like CCoV" (FCoV-benzer CCoV) olarak adlandırılmışlardır. Bu viruslar tip 1 olarak belirlenmiştir. Klasik CCoV suşları ise CCoV tip 2 olarak adlandırılmışlardır (Pratelli ve ark., 2003a). CCoV tip 2 de kendi arasında CCoV tip 2a (klasik CCoV suşları) ve tip 2b (TGEV-benzeri suşlar) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Decaro ve ark., 2009). CCoV tip 2 ise tip 2a tip 2b olmak üzere iki alt serotipe ayrılır. Ayrıca önerilen CCoV tip 2c de bulunmaktadır. Her iki serotip de birbirleriyle yakın ilişkili olmalarına karşın, spike proteinleri bakımından oldukça farklı bir yapıya sahiptir (Pratelli ve ark., 2003a). Benzer durum kedilerden elde edilen CoV'lar için de geçerlidir. FCoV, FCoV tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki eş serotipe ayrılırken, antijenik olarak spike proteinleri birbirlerinden oldukça farklıdır (Haijema ve ark., 2007). CCoV tip 1 ve tip 2'ye ait genom yapıları Şekil 1.2'de gösterilmiştir. CCoV tip 1 virusları, CCoV varyantı olan Elmo/02 suşu baz alınarak M geni dizin analizleriyle klasifiye edilmiştir (Pratelli ve ark., 2001; Pratelli ve ark., 2003c).



Şekil 1.2. CCoV ve FCoV genomlarının genetik farklılıklarının şematik gösterimi (Decaro ve ark., 2009)

Yapılan çalışmalarda CCoV tip 1 ve tip 2 arasındaki genomik farklılıklar belirlenmiş olup, başlıca farklılığın da spike proteinleri ve iki virus arasındaki serolojik özelliklerin farklılığından kaynaklandığı bildirilmiştir (Lorusso ve ark., 2008). Bu ayrımın başka bir açıklaması ise doğal koşullar altında, yüksek homoloji gösteren CoV'ler arasında (CCoV ve FCoV gibi) sık sık meydana gelen rekombinasyon olaylarıdır. Oluşan rekombinasyonların yeri tam olarak bilinmemekle birlikte CCoV'nin feline aminopeptidaz (fAPN) glikoproteinini bir hücresel reseptör olarak kullanabileceği varsayımı üzerinden hareket edilmektedir. Ayrıca deneysel şartlar altında kedilerin, CCoV ile enfekte olabileceği bilinmektedir (Pratelli ve ark., 2003a).

CCoV tip 2'ler de kendi içlerinde CCoV tip 2a ve tip 2b olmak üzere spike proteinin ilk 300 aa'nin dizin analizlerine göre ikiye ayrılmaktadır. S proteinin N-terminal bölgesi (NTD) denilen bu kısım, aynı aileden yakın ilişki bir virus olan TGEV'de, intestinal tropizmin önemli bir determinantıdır (Krempl ve ark., 1997).

CCoV tip 2a, patojenite ve hücre tropizmi açısından iki farklı biyotipe sahiptir:

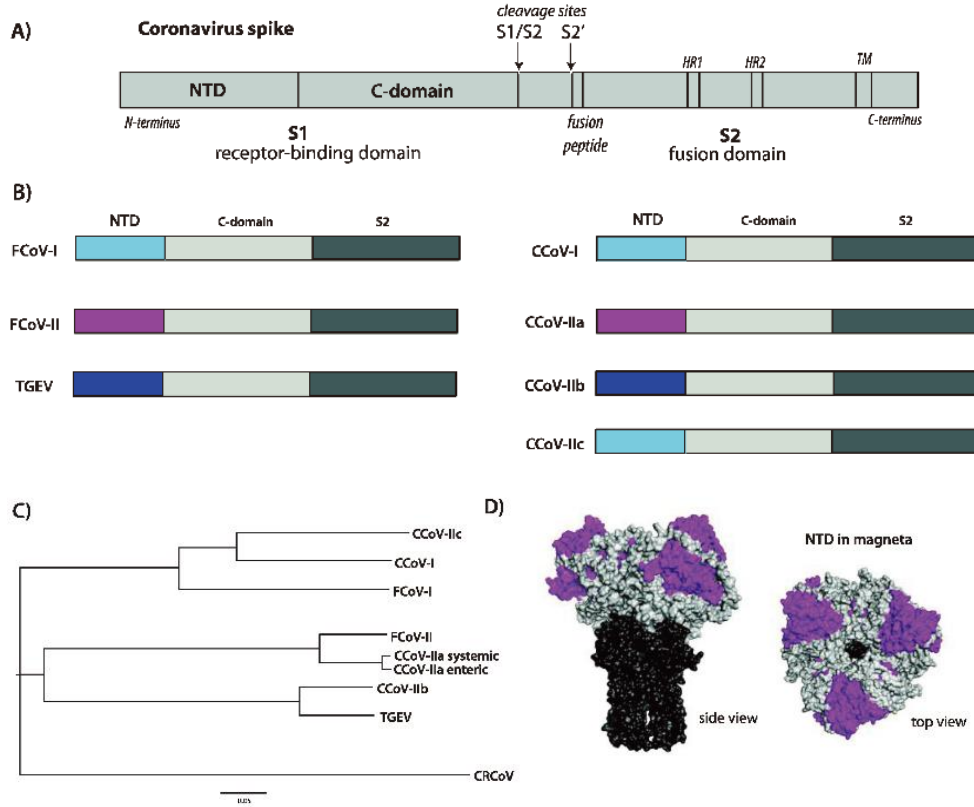
- 'Klasik' CCoV tip 2a biyotipi, ince bağırsaklar ile sınırlı kalarak enteritise sebep olur.
- 'Pantropik' CCoV tip 2a biyotipi ise sistemik olarak yayılabilir ve özellikle lökopeniye sebep olur (Decaro ve ark., 2008a, Decaro ve ark., 2012). CB/05 ve 450/07 isimli izolatlar; pantropik CCoV'lerin prototipi olarak kabul edilmektedir (Decaro ve ark., 2007).

CCoV tip 2b, genetik olarak CCoV tip 2a'dan farklı olup, S geni TGEV-benzeri N terminal bölgeye sahiptir. TGEV gibi bu virus da yeni doğarlarda enteritise neden olmaktadır. CPV ile miks olan CCoV tip 2b enfeksiyonlarında CCoV RNA'sı, bağırsak dışında çeşitli organlarda da PCR tekniği ile pozitif bulunmuş olduğundan bu durum generalize enfeksiyona kanıt olarak kabul edilmiştir. Bu virusun prototipi olarak 341/05 suşu uygun görülmüştür (Decaro ve ark., 2008b, Ntafis ve ark., 2011).

CCoV tip 1 izolatlarının hücre kültürü sistemlerinde çoğaltılması güç olduğundan; bu durum virusla ilgili çalışmalara engel teşkil etmektedir (Licitra ve ark., 2014). In vivo koşullarda CCoV tip 1'lerin genellikle CCoV tip 2 virusları ile birlikte sirküle olduğu ve sıklıkla birlikte enfeksiyon (co-infection) meydana getirdikleri ifade edilmiştir (Wang ve ark., 2006; Ntafis ve ark., 2011). Birlikte enfeksiyonlar yaygın olarak gözlenmekte olup, CoV replikasyonunda kendiliğinden ortaya çıkan rekombinasyon yeteneğiyle birlikte yeni rekombinant virusların oluşumu tetiklenir. 1976 yılında izole edilen A76 virusun, aslında CCoV tip 1/CCoV tip 2 rekombinasyonu sonucu oluştuğu ve bu iki tipe ait farklı S proteinlerini içerdiği tespit edilmiştir (Regan ve ark., 2012). Benzer durum; feline kökenli CCoV suşları gibi köpeklerden izole edilen CCoV tip 1 benzeri viruslar için de geçerli olup, Elmo/02 bu virusların prototipi olarak kabul edilmektedir

(Escutenaire ve ark., 2007). Elmo/02 suşu, S gen bölgesi nükleotid sekansları yönünden %80 oranda feline kökenli CoV'lar ile benzer bulunmuş olup; referans CCoV suşlarından oldukça farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu kanıtlar; bu virusun yeni bir CCoV tipi olduğunu göstermektedir ve FCoV-1 ile yakın olması sebebi ile FCoV benzeri Canine CoV olarak anılması uygun görülmüştür (Decaro, 2009).

A-76-benzeri virusların NTD'lerine göre yapılan yeni sınıflandırmada ayrı bir alt gruba ait oldukları tespit edilerek, bu yeni alt gruba CCoV tip 2c ismi verilmesi önerilmiştir (Escutenaire ve ark., 2007). CoV'un NTD dizin analizlerinden elde edilen sonuçlara göre tanımlanan CCoV tip 2c alt grubunda; CCoV tip 1 ve FCoV tip 1-benzeri viruslarının yer aldığı; hem İngiltere hem de İsveç'ten bildirilen yayınlarda rapor edilmiştir (Sanchez ve ark., 2004; Escutenaire ve ark., 2007; Regan ve ark., 2012; Licitra ve ark., 2014). Ayrıca CCoV A76, CCoV tip 2c için uygun bir prototip olduğuna karar verilmiştir (Regan ve ark., 2012). CCoV'lerin farklı S protein bölgeleri ve NTD filogenilerini gösteren bilgiler Şekil 1.3'de yer almaktadır.



Şekil 1.3. Coronavirus spike proteini bağlanma bölgeleri ve CCoV'nin filogenideki yeri (Licitra ve ark., 2014)

1.1.1.1. Virusun Yapısı

Coronavirus zarlı, 120-160 nm çapında, helikal simetrik, tek iplikçikli, pozitif polariteli, segmentsiz bir RNA virusudur. Virusun elektron mikroskop (EM) görüntüsü oldukça karakteristiktir. EM'de taç şeklindeki çıkıntılardan dolayı Latince 'taç' anlamına gelen 'corona' ismi verilmiştir. Virusun tam genomu 27,6-31,3 kb uzunluğunda değişmektedir.

1.1.1.1.1. Virusun Viral Proteinleri

Coronavirüslerin tamamında bulunan dört yapısal proteini ve polimerazı (pol) kodlayan genlerin 5'-Pol-S-E-M-N-3' şeklinde düzenleri vardır ve bu düzen tüm coronavirus genomlarında korunmuştur (Jackwood, 2006).

1.1.1.1.1. Spike (S) Glikoproteini

Virion yüzeyinde bulunan ve virusa ismini veren (corona-ta) yapıyı oluşturan bu glikoprotein (Spike-S), önceleri ‘E2’ olarak da adlandırılmaktaydı. Tip 1 membran glikoproteini olan S proteini, 150-200 kDa ağırlığında olup, virus suşlarına göre farklılık göstermekle birlikte 1200-1600 aminoasit (aa) içermektedir.

- S glikoproteininin çeşitli biyolojik fonksiyonları da vardır:

1. S glikoproteini, enfekte konağın immun sisteminin virusu tanımasında birincil unsurdur. Enfeksiyon esnasında meydana gelen nötralizan antikorların baş indükleyicisidir (Spaan ve ark., 1988). Spesifik monoklonal antikorları ve virus enfektivitesini nötralize edebilir. Bu durum, S glikoproteininin hücresele reseptörlere bağlandığı görüşünü kanıtlamaktadır.
2. S1 bölgesinin aminoasit dizilimi, hayvanlardaki Coronavirus’ların hedef hücre özgülüğü için oldukça kritiktir. Bu durum, özellikle SARS-CoV’da iyi tanımlanmıştır: Virus; yarasadan palmiye misk kedisi ve insanlara geçerken, S glikoproteini, konak hücre reseptöründeki (ACE2) tür-spesifik farklılıklara adapte olmuştur (Lai ve ark., 2007).
3. Membran füzyon aktivitesinden, S2 içindeki internal hidrofobik sekansların sorumlu olduğu düşünülmektedir.
4. S glikoproteini konak hücredeki spesifik reseptöre bağlanarak, viral zarf ile konak hücre membranının füzyonunu; ayrıca hücre-hücre füzyonunu da indüklemektedir. Sadece S proteininin ekspresyonu, reseptör taşıyan hücrelerin füzyonunu indükleyebilir. S glikoproteininin dikkat çeken bu özelliğı ile spesifik reseptör yokluğunda da, hücre-hücre füzyonunu

indükleyebilmektedir. Bu füzyon yeteneği sayesinde, virulans artışına da yol açmaktadır (Lai ve ark., 2007).

5. MHV ile enfekte hücrenin membranındaki S proteininin varlığı, hücreyi B hücre bağlantılı sitotoksositeye duyarlı kılmaktadır. Bazı Coronavirus'ların (MHV, TGEV) S glikoproteini, IgG'nin Fc fragmentine bağlanabilme yeteneğindedir. Bu özellik sayesinde antikorlara karşı virusu koruyarak, viral patogeneze rol oynadığı düşünülmektedir. BCoV ve HCoV-OC43'ün S proteinleri ayrıca glikan ihtiva eden 9-O-asetil nöraminik (sialik) aside bağlanabilmektedir. Bu bağlantı ile duyarlı hücrelerde enfeksiyon başlangıcını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. S proteini, hemaglütinasyon aktivitesine de sahiptir (Lai ve ark., 2007).

6. IBV ve MHV'un S glikoproteini içermeyen virionları, enfeksiyöz değildir (Spaan ve ark., 1988).

APN (Aminopeptidaz N), FCoV (Feline Coronavirus) ve TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus)'i de içeren birçok *Alfacoronavirus* için genel bir reseptör olarak etki gösterir (Wentworth ve ark., 2001). Her bir virus kendi içinde türe spesifik homolog reseptör kullansa da; feline homolog (fAPN), FCoV tip 2, CCoV tip 2 ve TGEV için ortak bir reseptör olarak etki gösterir (Tresnan ve ark., 1996). Bu özellik diğer birçok Coronavirus'un da tersinedir. Zira CoV'lar genellikle yüksek tür spesifik reseptörlere sahiptirler. Reseptör-bağlanma yeteneğinin bu kadar geniş olmasının zoonotik transfer ve genetik rekombinasyon olaylarında olası rol oynadığı ve hayvanların coronaviruslarının evrimini açıkladığı düşünülmektedir (Vijaykrishna ve ark., 2007). Human alfacoronavirus HCoV-229E için, hem feline hem de human APN reseptörken, diğer bir human alfacoronavirus olan NL63 için değildir (Hofmann ve ark., 2005). Muhtemelen tüm CCoV tip 2'ler için canine APN, in vivo reseptör olarak rol oynar. CCoV tip 2c A76 için ise, S glikoproteininde farklı bir APN-bağlanma alanı var olup, 'C bölgesi' adı verilen bu bölge, fAPN'yi reseptör

olarak kullanamazken, cAPN'yi reseptör olarak kullanabilmesine neden olmuştur. fAPN ve cAPN'nin karşılaştırılmasında, glikozilasyondaki eksikliklere bağlı olarak bu iki reseptörün farklılıkları hesaplanabilir (Regan ve ark., 2012).

FCoV ve CCoV tip 1 için reseptör determinantları belirli değildir. FCoV tip 1 reseptörü olarak fAPN'nin olduğuna dair bazı kanıtların olmasına rağmen (Tresnan ve ark., 1996), diğer çalışmalarla FCoV tip 1 için farklı reseptörün olduğu sonucuna ulaşılmıştır. CCoV tip 1 virusları için ise reseptör determinantları halen belirsizliğini korumaktadır (Hohdatsu ve ark., 1998; Dye ve ark., 2007).

Spesifik proteinli reseptörlere ek olarak, virusta ya da konakçıda şeker parçalarının lektin-bazlı etkileşimleri, FCoV tip 1 ve tip 2 ve TGEV için reseptör-bağlanma komplekslerinde rol oynayabilir. Aynı durum CCoV için de geçerli olabilir. Birçok coronavirus sialik asite bağlanır ki, sialik asit doku tropizmi ve patogenezin önemli bir determinanı olabilir. Fakat sialik asit, FCoV'ler ve CCoV'ler için henüz incelenmemiştir (Schultze ve ark., 1996; Kreml ve ark., 1997; Regan ve ark., 2008; Regan ve ark., 2010; Van Hamme ve ark., 2011). Coronavirus S glikoproteini, proteolitik bölünme (Proteolytic Cleavage) ile bir ya da iki parçaya (S1/S2 ve S2) aktive olur (Masters ve ark., 2013). S1/S2'deki cleavage'ın (katlanma, bölünme) gerçekleşip gerçekleşmemesi durumu her bir coronavirus için farklılık gösterir (Bosch ve ark., 2008).

S proteini N-terminus ucundan, C-terminus ucuna doğru üç yapısal bölgeye ayrılır:

1. S1 ve S2 olarak iki alt bölgeye ayrılan büyük dış bölge (a large external domain)
2. Transmembran bölgesi
3. Kısa bir karboksiterminal bölgesi

S1 alt bölgesi, molekülün N terminal kısmını oluşturur ve uç kısımlarda bulunan bu yapı, virusun hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmasından sorumludur. Hem farklı genustaki CoV'lar hem de CoV'un farklı suşlarında bulunan S1 glikoproteini, uzunluk ve nükleotid dizinleri olarak önemli derecede farklılıklar içerir. Örneğin; zürafadan izole edilen CoV'un (GiCoV), sığırdan izole edilen CoV'na (BCoV) göre S1 proteininde 5 aa'lık eksik olduğu bilinmektedir (Hasöksüz ve ark., 2007). Bu viruslar, germ-free olan buzağılara inokule edildiğinde, BCoV'dan daha şiddetli bir enfeksiyon oluşturdıkları bildirilmiş ve hücre kültürlerinde virus titrelerinin oldukça yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca sığırlarda enteritise sebep olan CoV'ların S proteinindeki aa değişimi sonucunda solunum sisteminde de enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. Bu durum; S proteinindeki mutasyonların enfeksiyon üzerindeki önemini göstermektedir. Oluşan mutasyonlar ve CoV'lar arasındaki rekombinasyon sonucu virus tropizminin değişimine kanıt niteliğindedir (Buonavoglia ve ark., 2006).

S2 alt bölgesi ise, S1 alt bölgesinin aksine oldukça korunaklı bir bölgedir ve spikelerin sap kısmını oluşturmaktadır. S2'deki cleavage, genel olarak S1'e göre daha gereklidir ve viral füzyon peptidinin ortaya çıkmasıyla direk bağlantılıdır (Belouzard ve ark., 2009, Madu ve ark., 2009, Wicht ve ark., 2014). Çok sayıda proteazın (tripsin veya tripsin benzeri proteazlar, katepsin, elastaz veya furin) aktivasyonu ile iki parçalı cleavage meydana gelebilir (Belouzard ve ark., 2012).

Hem FCoV ve hem de CCoV'ların tip 1 ve tip 2 lineagelarının S proteini cleavage aktivasyonunda belirgin farklılıklar vardır (Şekil 1.4).

- Tip 1 lineage, iki farklı proteaz cleavage motifi bulundurur: S1/S2'de R-R-S/A-R-R-S/A ve S2'de ise G/K-R-S.

- Tip 2 lineage'da S1/S2'de belirgin bir motif kaybı vardır, S2'de ise tek bir belirgin cleavage motifi bulunur: R-K-R-Y/F-R-S.

Bu bulgular, bu iki hattaki virusların cleavage aktivasyonlarının birbirlerinden oldukça farklı olduğunu göstermektedir (Licitra ve ark., 2013). Furin proteazı aracılığıyla cleavagedeki değişiklikler Feline CoV'lardaki mutasyonlarla bağlantılı bulunmuştur. Kedilerdeki mutant CoV'un (FIP) makrofaj tropizmi bu mutasyonlarla açıklanmakta iken (Licitra ve ark., 2013), CCoV enfeksiyonlarındaki cleavage alanları mutasyonları için halen herhangi bir kanıt yoktur (Viruses, 2014).

	S1/S2	S2'	
CCoV-I	HTHTVRRARRAVQTGTTITA	AQPGGRSAIEDLLF	alphacoronavirus
FCoV-I	NHTQPRRSRRSTPNSVTTYT	PKIGKRSAVEDLLF	alphacoronavirus
CCoV-IIa	WTTT-----PNFYYSI	SKRKYRSAIEDLLF	alphacoronavirus
CCoV-IIb	WTTT-----PNFYYSI	SKRKYRSAIEDLLF	alphacoronavirus
CCoV-IIc	YIVT-----PSFYYSI	SKRKFRSTIEDLLF	alphacoronavirus
FCoV-II	WTTT-----PNFYYSI	SKRKYRSAIEDLLF	alphacoronavirus
TGEV	WTTT-----PNFYYSI	SKRKYRSAIEDLLF	alphacoronavirus
CRCoV	GYSTQRRSRRSITTGYRFTN	NKVSSRSAIEDLLF	betacoronavirus

Şekil 1.4. Kedi (FCoV), köpek (CCoV) ve domuz (TGEV) S glikoproteinlerinin dizin karşılaştırmaları (Licitra ve ark., 2014)

CCoV'ler, diğer coronaviruslar gibi yüksek mutasyon gösterirler ve son 10 yılda da farklı birçok suş tanımlanmıştır. Bunların ilki Wesley (1999) tarafından gözlemlenmiştir. CCoV'lara ait genetik dizinlerin çoğu FCoV-like CCoV olmasına rağmen, bir CCoV suşu olan UCD-1'in S geninin, TGEV'le daha yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2001 yılında Avustralya'daki köpek üretme çiftliklerinde ölümle sonuçlanan gastroenteritisli vakalardan izole edilen CCoV suşu UWSMN-1, S ve polimeraz genlerinin fragmentlerinin dizin analizleri incelendiğinde, bu izolatın CCoV ve FCoV'nin klasik suşlarından farklı olduğunu göstermiştir. S geninin 3' bölgesindeki 751 nükleotidin kıyaslanması

yapıldığında, UWSMN-1'in 21 farklı bölgeye sahip olduğu ve analiz edilen suşlardan en az 112 farklı bölgesi olduğu bulunmuştur (Naylor ve ark., 2002).

Değişen tropizm ve patogenezle birlikte yeni varyantların ortaya çıkma ihtimali oldukça yüksektir. Bu durum için; viral genomdaki mutasyon ve rekombinasyonların kombinasyonu ile virus ve viral spike protein için olan doğal rezervuarların artması, vb. faktörler sıralanabilmektedir (Graham ve ark., 2010).

1.1.1.1.2. Membran Glikoproteini (M)

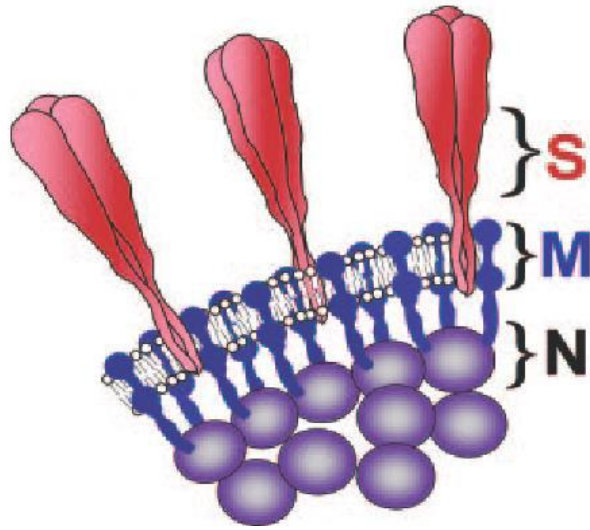
Kapsitin oluşumunda görev alan, 25-35 kDa ağırlığında, virusun zarında bol miktarda bulunan bu protein, önceleri 'E1' olarak isimlendirilmiştir (Thiel, 2007). CoV'un diğer glikoproteinlerinden farklı olarak membran glikoproteininin (M), sadece kısa bir amino terminal bölgesi vardır ve bu bölge viral zar dışında açıkta kalmaktadır (Lai ve ark., 2007). Bu bölgeyi takiben bir α -heliks bölgesi ve viral zarfın içinde büyük bir karboksiterminal bölge de bulunmaktadır. TGEV gibi bazı CoV'larda M glikoproteininin karboksiterminal kısmı, virion yüzeyinde açıkta kalmaktadır (Lai ve ark., 2007).

M glikoproteini (Şekil 1.5) membranı üç kez sararken, virionun içine ve dışına doğru endo/ektodomainler oluşturur, böylelikle virionun stabil bir yapıda kalmasını sağlar. Endo ve ektodomainler, CoV zarının elektron mikroskopik preparatlarda kalın görünmesine sebep olur.

M glikoproteininin Corona-, Toro- ve Bafinivirüslerde dizin ve yapı olarak farklılıkları gösterilmiştir (Thiel ve ark., 2007).

M'nin dış bölgesine karşı oluşmuş bazı monoklonal antikolar, virus enfektivitesini nötralize etmektedir (Lai ve ark., 2007).

M glikoproteini, replikasyonda viral partiküllerin birleştirilmesi ve olgunlaşmasında anahtar bir role sahiptir (Lai ve ark., 2007). RNA'ya affinitesi olduğu gösterilmiştir. Viral RNA paketleme sinyaliyle etkileşerek, nukleokapsitlerde virus RNA'sının paketlenmesinde de kritik role sahip olduğu düşünülmektedir. N ve S glikoproteinlerinin ikisiyle birden etkileşimdedir. N ile etkileşimde olması, nukleokapsitle ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Lai ve ark., 2007). Bu durum in vitro koşullarda MHV'un M glikoproteininin, izole edilmiş nukleokapsite bağlandığının gösterilmesiyle de kanıtlanmıştır. TGEV ve MHV'da, nukleokapsit dışındaki kabuğu oluşturur. Bazı CoV'ların M glikoproteini, interferon alfa oluşmasını indüklemektedir (Lai ve ark., 2007).



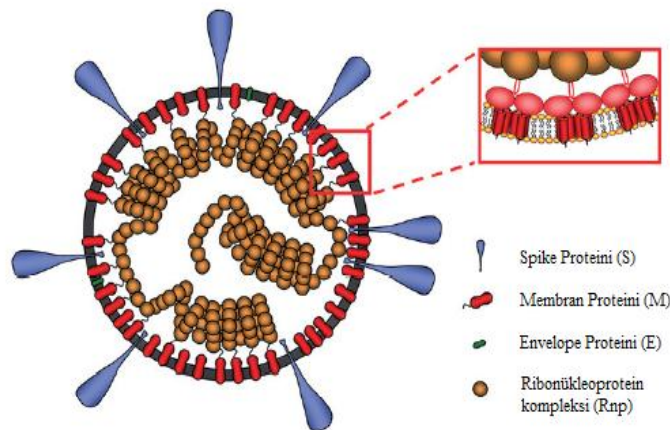
Şekil 1.5. CoV proteinleri yakın görünüm (Neuman, 2006)

İtalya'nın güneyindeki ishalleri köpeklerden 2001 yılında alınan dışkı örneklerde belirlenen CCoV'nin dizin analizleri ile M geninde çoklu (multiple) nükleotid (nt) değişmelerinin toplandığı gözlenmiştir (Pratelli ve ark., 2001). Doğal enfekte olmuş 2 köpeğin uzun dönem viral saçılımının

geç faz boyunca belirlenen CCoV'lerin dizinlerinde M geninin nokta mutasyonlarının etkileri gözlenmiştir. Bu CCoV'ler 1971-benzeri CCoV'lerden farklı olup, FCoV tip 2'ye belirgin bir genetik drift olduğunu gösterir ve bu durum, bahsi geçen 2 köpeğin genetik olarak farklı CCoV'lerin karışık bir popülasyonu ile enfekte olmuş olabileceği veya her iki köpekte de belirlenen virusların mutasyon/rekombinasyon olaylarının sonucu olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir (Pratelli ve ark., 2002b). Bahsi geçen başlangıç gözlemleri CCoV'nin genetik evrimi çalışmalarıyla ilgili anlamlı bir etki kazanmıştır.

1.1.1.1.3. Zarf Glikoproteini (E)

Ağırlığı 9-12 kDa olan ve önceleri 'sM (small membran)' olarak adlandırılan bu protein, *Coronaviridae* ailesi üyelerinden sadece CoV cinsinde tespit edilmiştir. Viral zarda az miktarda bulunan ve küçük olan bu protein, pentamerik yapıda olup internal membran proteinidir (Şekil 1.6). Virion partiküllerinin birleştirilmesinde rol oynadığı bilinmesine rağmen, bu olay için varlığının şart olmadığı belirtilmektedir (Siddel ve ark., 2005). Zira E proteini ekspresyonu eksik olan virusla enfekte edilmiş hücrelerden, anormal şekilli de olsa virionların salındığı belirlenmiştir (Lai ve ark., 2007).



Şekil 1.6. CoV proteinleri (Hagemeijer, 2011)

Enfekte hücre içinde tomurcuklanma için, hem E hem de M glikoproteini gereklidir. Kıvrılarak lipit tabakayı bozması, virus tomurcuklanmasındaki rolünü açıklar.

İyon değişimi ve/veya membran geçirgenliğini arttıran (viroporin) aktivitelerine sahiptir. Virion başına 20 kopya sayısıyla minör yapısal bileşen olup, viral morfogenezde rol aldığı düşünülmektedir (Thiel, 2007).

Ayrıca; SARS-CoV, HCoV-229E, MHV ve IBV'da E proteininin, soyunma ve olgun virionların salınımında, iyon kanalı gibi fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007). MHV ve SARS-CoV'da apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Thiel, 2007).

1.1.1.1.4. Nükleokapsit Fosfoproteini (N)

N fosfoproteini (Çizelge 1.2), 50-60 kDa ağırlığında olup, viral sarmal nükleokapsiti oluşturmak için genomik RNA'ya bağlanır. M ile direkt etkileşimde olan bu fosfoprotein, RNA zincirinin dayanıklılığını sağlar (Lai ve ark., 2007). Virusun tomurcuklanması esnasında N fosfoproteininin, M'nin sitoplazmik bölgesine bağlandığı düşünülmektedir. Bu etkileşim ile virus partiküllerinde nükleokapsidin kaynaşmasını sağlar (Holmes ve Lai, 1996). N fosfoproteinine karşı oluşan antikorun, in vitro CoV RNA polimeraz reaksiyonunu inhibe ettiğini gösteren bir çalışmaya göre bu protein, viral replikasyonda da rol oynamaktadır. Bu çalışmayla paralel olarak N fosfoproteini, viral RNA'nın üretildiği ve toplandığı bölgelerde lokalize olur. Bu sayede, RNA replikasyon komplekslerinin oluşumunu ve virus partiküllerinin birleştirilmesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca hücresel bağışıklığı da indüklediği bilinmektedir (Lai ve ark., 2007).

Çizelge 1.2. Coronavirus yapısal proteinlerinin özellikleri ve fonksiyonları

Protein ismi	Görevleri
Nükleokapsit fosfoprotein N	Viral RNA'ya bağlanma Nükleokapsit oluşumu Hücrel bağışıklığı uyarma
Membran glikoprotein M (önceden E1 olarak adlandırılan)	Golgide integral membran proteini Virus tomurcuklanma bölgesini belirleme Virus partikül birleşimini artırma Viral nükleokapsitlerle etkileşime girme İnternal viral çekirdek kabuğunu oluşturma (TGEV and MHV)
Zar (small membrane) protein E (önceden SM olarak adlandırılan)	Virus partikül birleşimini artırma Viral zarfla ilişki kurma Apoptosise neden olma
Spike glikoprotein S (önceden E2 olarak adlandırılan)	Spesifik hücrel reseptörlere bağlanma Hücre membranları ile viral zarfın füzyonunu indüklemek (plazma membranı ya da endozomal membran) İmmunoglobulinin Fc parçasına bağlanma (MHV and TGEV) 9-O-asetilleştirilmiş nöraminik asit ya da N- glikolilnöraminik asite bağlanma Nötralize edici antikor indüklemek Hücrel bağışıklığı uyarma
Hemaglutinin-esteraz glikoprotein HE (önceden E3 olarak adlandırılan)	Bazı coronavirusların virion yüzeyinde küçük spike'lar oluşturma 9-O-asetilleştirilmiş nöraminik asite bağlanma Hemaglutinasyona neden olma Hemadsorpsiyona neden olma 9-O-asetil nöraminik asit grupları, asetil esteraz bölünmesi

TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus;
MHV, murine hepatitis virus.

1.1.1.1.5. Hemaglutinin-Esteraz Glikoproteini (HE)

Grup 3 Hindi Coronavirusu (TCoV) ile bazı Grup 2 CoV'lar (HEV, BCoV, MHV, HCoV-OC43)'da bulunan 65-70 kDa ağırlığında olan Hemaglutinin-Esteraz-Glikoproteini (HE), önceden 'gp65 glikopeptit' ya da 'E3' olarak adlandırılmaktaydı (Lai ve ark., 2007). Virion üzerinde kısa uzantılar olarak

görülen bu proteinin bazı CoV'larda bulunmakta olup, viral replikasyon için gerekli olmadığı düşünülmektedir. Devamlı hücre kültürü pasajlarında, ya yapısı sıklıkla mutasyona ya da tamamen delesyona uğramaktadır (Siddel ve ark., 2005; Lai ve ark., 2007). Virus partiküllerinin hücreden salınmasında rol oynayan esteraz aktivitesi ve yüksek hemagglütinasyon özelliği vardır; hemadsorbsiyona sebep olabilir. Bu özellikleri ile Hemagglütinin-Esteraz glikoproteini:

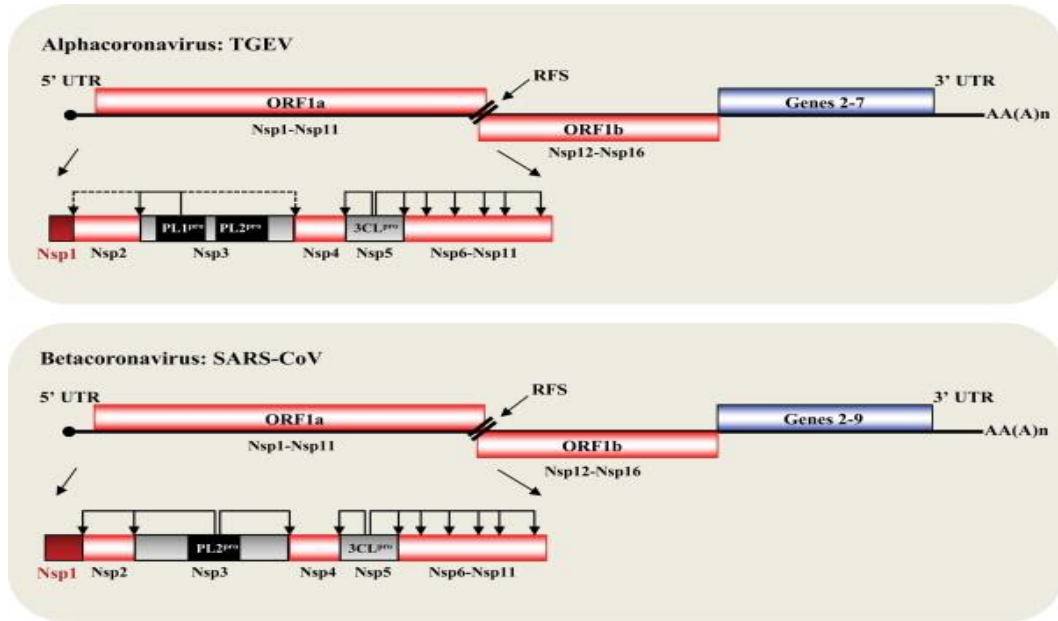
- Virusun titresini ölçmede (Holmes ve Lai, 1996),
- Suşlar arasındaki biyolojik özelliklerin ortaya konulmasında,
- Hemagglütinasyon, hemagglütinasyon inhibisyon ve reseptör inhibe eden enzim aktivitelerinin (receptor-destroying enzyme activity) titrelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır (Hasöksüz ve ark., 1999).

BCoV ve HCoV-OC43'ün S glikoproteinleri gibi, çeşitli CoV'ların HE glikoproteini, 9-O-asetil nöraminik aside bağlanabilir ve bu gruptan asetil gruplarını ayıran asetilesteraz aktivitesi, hücre yüzeyine yapışan virionların ayrılmasını sağlamaktadır. HE'nin 9-O-asetil nöraminik aside bağlanmasının, konak hücre membranında virusun yoğunlaşmasını sağlayarak, bu yolla S glikoproteininin spesifik reseptörüne bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Bu özelliklerinden dolayı HE'nin, hedef hücreye virusun bağlanmasında ya da enfekte hücreden virus salınımında sorumlu olduğu düşünülmektedir (Lai ve ark., 2007).

Tüm CoV'lardaki gen diziliminde olmayan HE glikoproteini ve yapısal olmayan proteinler için türlere göre belirgin farklılıklar vardır. Bu farklılıklar; sayı, nükleotid dizini, gen düzeni ve ekspresyonudur. Farklılıklara rağmen aynı grup içinde korunan bu proteinler 'grup-spesifik proteinler' olarak adlandırılmaktadır (Lai ve ark., 2007).

1.1.1.1.6. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP)

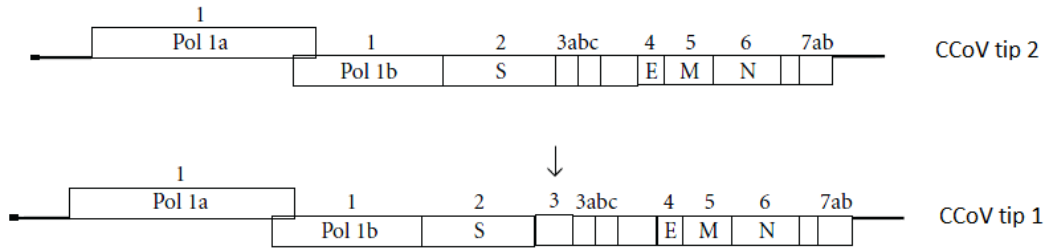
CoV'ların yapısal olmayan proteinleri açık okunabilir bölge olarak tanımlanan ORF (Open Reading Frame-ORF) bölgesinde bulunmaktadır. ORF1 iki kısımda incelenmekte olup, ORF 1a'nın N terminal ucundan başlayan ve ORF1b'nin C terminal ucuna kadar devam eden bölgede; 16 adet yapısal olmayan protein bulunmaktadır (Şekil 1.7). Viral RNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan bu proteinler, enzimatik aktivitelerde de önemli görevlere sahiptir (Narayanan ve ark., 2014). Farklı CoV'larda; ORF1'in N terminal bölgesinin ortalarından başlayan ve C terminal uca doğru sonlanan NSP3-NSP16 arasında bulunan bölge korunaklı özelliğe sahipken, özellikle NSP1 dizininde yüksek oranda farklılıklar görülmektedir (Connor ve Roper, 2007). *Alfacoronaviruslar* ve *Betacoronavirusların* NSP1 bölgelerine yönelik yapılan çalışmalarda; dizinlerin ve protein motiflerinin farklılıkları olmasına rağmen, biyolojik fonksiyonlarında benzerlikler tespit edilmiştir. Bu proteinin, farklı lineajlarda bulunan CoV'ların yaşam döngüsündeki önemi gösterilmiştir (Narayanan ve ark., 2014).



Şekil 1.7. Coronavirusların yapısal olmayan proteinlerinin şematik gösterimi (Narayanan ve ark., 2014)

CoV'ların yapısal olmayan proteinleri, virus replikasyonunda zorunluluk arz etmemesine rağmen, bu proteinlerde meydana gelebilecek delesyonlar viral attenüasyona sebep olmaktadır (Lai ve ark., 2007).

Genomun en korunaklı bölgesi, polimeraz (Pol) genidir (Şekil 1.8) ve bazı araştırmacılar tarafından ORF 1 bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Pan generik corona primerleri genellikle bu bölgeden seçilerek genel CoV tanısı yapılabilmektedir (Hasöksüz, 2008).

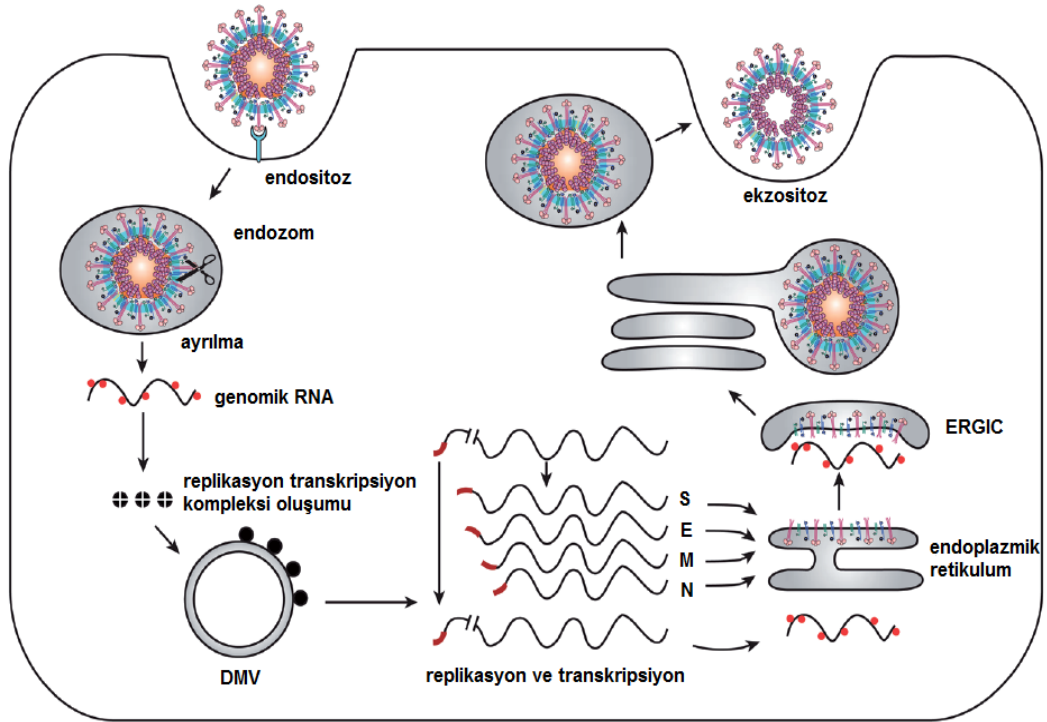


Şekil 1.8. CCoV tip 1 ve tip 2'nin Pol geninin şematik gösterimi (Pratelli, 2011)

1.1.2. Virusun Replikasyonu

Coronavirüslerin replikasyon siklusu (Şekil 1.9), viral partiküllerin spike protein aracılığıyla hücre yüzeyine tutunmasıyla başlar. İlk tutunmayı hücre-yüzey heparan sülfat proteoglikanları aracılığıyla yapan S proteini, viral ve hücre membran füzyonu amacıyla üç boyutlu yapısında değişikliğe gereksinim duyar (Lai ve ark., 2007). Özellikle SARS CoV'lar asidik pH'da hücre içine girebilmekteyken, S proteini bağlantılı hücre içine girişi tercih eden CoV'lar nötr veya alkali pH'da hücreden hücreye füzyon yolu ile geçebilmektedir. SARS CoV'da membran füzyonu endozomlar içindeki katepsin L aracılı proteolizis ile gerçekleşir (Nash ve Buchmeier, 1997). Bu olay, alfa ya da betacoronavirüslerde endozom içinde olur (Huang ve ark., 2006). Virusa ait membran ile konakçıya ait hücresel membranların birleşmesinden sonra viral nükleokapsit, replikasyonun gerçekleşeceği sitozolün içerisine bırakılır. Konakçı ribozomları ORF 1a/1ab'yi hem

poliprotein 1a hem de poliprotein 1ab'ye çevirir. Bunlar daha küçük polipeptidlere parçalanır ve muhtemelen viral ve konakçı proteinlerini de içeren, replikasyon/transkripsiyon komplekslerini oluştururlar. Bu yapılar membran-bağımlı olup, virusla indüklenmiş çift membran vezikülleri (Double Membrane Vesicles-DMV) içinde yerleşirler. Bu bölgelerde progeni genomların replikasyonu ve subgenomik RNA'ların üretimi şekillenir. Çevrilmiş M, E ve S glikoproteinleri, sentezlenmiş ve enkapside olmuş genomlar gibi, ER- golgi ara bölümlerinde birikirler. Öncü viral zar ve nükleokapsit birleştiğinde, yeni virus partikülü ER-GIC lümenine tomurcuklanır. Buradan ekzositoz yollarıyla hücre membranındaki veziküllere taşınırlar ve salınırlar (Risco ve ark., 1996).



Şekil 1.9. Coronavirusların replikasyonu (Hagemeijer, 2011)

1.1.3. Canine Coronavirus'un (CCoV) Türlerine Göre Dağılımı

Alfacoronavirus ve *Betacoronavirus* genuslarında yer alan etkenlerden olan CCoV'lar; bu genustaki diğer viruslarla yakın genetik ilişkili olup, konakçılara ve virusun bağlanma reseptörlerine ait bilgiler Çizelge 1.3'de sunulmuştur.

Çizelge 1.3. Coronavirus'ların Primer Bağlanma Faktörleri ve Reseptörleri (ICTV 9. Raporu, 2009)

Virus	Konak	Bağlanma Faktörü	Reseptör
<i>Alfacoronavirus 1</i>			
Canine coronavirus tip I	Köpek		?
Canine coronavirus tip II	Köpek		APN
Feline coronavirus tip I	Kedi		?
Feline coronavirus tip II	Kedi		APN
Transmissible gastroenteritis v.	Domuz	Sialic acid	APN
<i>Human Coronavirus 229E</i>	İnsan		APN
<i>Human Coronavirus NL63</i>	İnsan		ACE2
<i>Betacoronavirus 1</i>			
Bovine coronavirus	Sığır		9-O-Ac Sia?
Canine respiratorik coronavirus	Köpek		
Equine coronavirus	At		9-O-Ac Sia?
Human coronavirus OC43	İnsan		9-O-Ac Sia?
Porcine H. Encephalomyelitis V.	Domuz		9-O-Ac Sia?
<i>Murine coronavirus*</i>	Fare	4-O-/9-O-Ac Sia	CEACAM1a
<i>SARS-related coronavirus</i>	İnsan		ACE2
<i>Gamacoronavirus</i>	Tavuk, Hindi		?
<i>Deltacoronavirus</i>	Bülbül, Munia		?

Kısaltmalar; APN: aminopeptidaz N, ACE2: angiotensin-converting enzim 2, CEACAM1: carcino-embriyonic antigen cell adhesion molecule 1. *: Murine coronavirusları iki şekilde ortaya çıkar; primer bağlanma faktörü olarak ya 4- ya da 9-O-acetylated sialic acid (O-Ac Sia) ve ana reseptör olarak CEACAM1a kullanılır.

1.2. Klinik Bulgular ve Patogenez

Enfeksiyon, klinik olarak oldukça değişken yapı göstermekte olup erişkinlerde klinik bir tablo oluşturmaz veya hafif semptomlu seyreder. Enfekte köpekler etkeni dışkı ile 6-9 gün boyunca yayarlar. Bu durum bazı hayvanlarda uzayabilir (Decaro ve Buonavoglia, 2008a). Köpeklerde hafiften şiddetliye kadar değişen klinik formdaki enteritis, genellikle yüksek morbidite ve düşük mortalite ile seyreder. Ancak diğer patojçığdemen etkenlerin varlığı (CPV-2, CAV-1, CDV ve sekonder bakteriyel etkenler) (Decaro ve ark., 2006b), çevresel stres faktörlerin yüksek oranda oluşu, hijyenik yetersizlikler, maternal antikorları olmayan 12 haftalıktan küçük köpekler, maruz kalınan CoV miktarı ve/veya pantropik tipteki CCoV'ın enfeksiyona neden olması ile klinik bulgular ağırlaşarak ölümle sonuçlanmaktadır (Zicola ve ark., 2012, Castanheira ve ark., 2014).

Fekal-oral yol, CCoV'ların bulaşmasında birincil öneme sahiptir. Bununla birlikte solunum yolu da dahil olmak üzere başka nakil yollarının varlığı, halen kesinlik kazanmamıştır (Licitra ve ark., 2014). Etkenin fekal-oral yolla organizmaya girişini takiben CCoV, ince bağırsağın villus epitelinde, apikal bölgedeki enterositlerin içinde üremeye başlar. Etken, ince bağırsaklarda jejunal ve duodenal villilerde tahribata yol açar. Bağırsak lumeni genişlemiş bir halde; gaz, sulu gıda içeriği ve dışkı ile doludur. Bağırsak mukozası ve mezenterial lenf nodülleri ödemli ve yoğun konjesyon dikkat çeker. Ayrıca kalın bağırsağın epitellerinde de üreyen CoV'lar, dışkıyla atılırlar (Pratelli ve ark., 2001).

1.3. Epidemiyoloji

CCoV enfeksiyonları tüm dünyada yaygın olarak bildirilmiştir. İtalya'da CCoV ile enfekte köpeklerden elde edilen dışkı örneklerinin biyomoleküler analizleri sonucu her iki genotipin (CCoV1 ve CCoV2) de varlığı

belirlenmiştir (Pratelli ve ark., 2004b; Decaro ve ark., 2005). Avusturya'da kedilerde yapılan bir çalışmada M geni sekanslarına göre CCoV tip 1-benzeri virusların varlığı bildirilmiştir (Benetka ve ark., 2006). Ayrıca İspanya, Fransa, Almanya, Belçika, İsveç ve Hollanda'da CCoV enfeksiyonunun varlığı ve yaygınlığı rapor edilmiştir (Escutenaire ve ark., 2007, Decaro ve ark., 2011a). İngiltere'de CCoV tip 2 enfeksiyonu CCoV tip 1'den daha yaygın olarak tespit edilmiştir (Stavisky ve ark., 2010). Çin'de de (Wang ve ark., 2006) enfeksiyonun yaygın olduğuna ve CCoV tip 1'in daha sık gözlemlendiğine dair raporlar bulunmaktadır. Çin'de, sağlıklı olan tilki ve rakunlarda her iki CCoV genotipine de rastlanmış, bunların İtalya'dan elde edilen CCoV M geni sekansları ile karşılaştırılmasında suşların yüksek genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Wang ve ark., 2006). Soma ve arkadaşları (2011) CCoV'u Japonya'da 1 yaşının altındaki köpeklerde %66,3 oranında var olduğunu ve köpeklerdeki enteritis vakalarında her iki genotipe %40'ın üzerinde rastlandığını rapor etmişlerdir.

Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalarda CCoV tip 1'in yaygın olduğu ortaya konulmuştur (Yeşilbağ ve ark., 2007).

1.4. Evrimsel Değişiklikler

Pozitif polariteli RNA viruslarında görülen yüksek mutasyonlar, köpek popülasyonları arasında sık rastlanan ve yine pozitif polariteli bir RNA virusu olan CCoV'deki evrimleşmenin açıklanmasında rol oynamış olup, son 20 yılda gelişen biyomoleküler teknikler ile sahadan izole edilen yeni virus suşlarının serotipleri ve subtipleri belirlenmiş; bunlardaki mutasyonların çeşitliliği üzerine çalışmalar yapılmasına imkan sağlanmıştır (Guan ve ark., 2003).

Viral genomdaki nokta mutasyonlar, delesyon veya insersiyonların kümeleşmesi ile yeni genotipler (CCoV tip 1 ve tip 2), biyotipler (pantropik CCoV, respiratorik CCoV) ve konakçı varyantları ortaya çıkmıştır. Zamanla giderek artan bu çeşitlilik, köpeklerdeki CoV'ların genetik evrimini açıklamada rol oynamıştır (Decaro ve Buonavoglia, 2008a).

CCoV tip 1 ve FCoV tip 1'lerin ortak ata virustan meydana geldiği, CCoV tip 2 ve FCoV tip 2 soylarının ise genetik kaynağı tam olarak belirlenemeyen çok sayıdaki rekombinasyonlar sonucu ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Lorusso ve ark., 2008). Feline kökenli CoV'ların prototipi olan ve 1979 yılında izole edilen FIPV WSU-79-1146'nın, aslında CCoV'un rekombinasyonu sonucu ortaya çıktığı (Herrewegh ve ark., 1998) ve sonraki yıllarda varlığı belirlenen başka rekombinant FCoV'lerin de olduğu tespit edilmiştir (Le Poder ve ark., 2013). Köpeklerin diğer türlerle ve özellikle de kedilerle ortak barındırılması ile birlikte türler arası geçiş riskinin artması ve bunun doğal sonucu olarak yeni rekombinant virusların oluşumu da dikkat çekici bulunmuştur (Le Poder ve ark., 2013).

Hafif şiddetten orta şiddete değişen kategoride enfeksiyonlara yol açan enteropatojenlerden sayılan CCoV'ların, 2005 yılında İtalya'da yavru köpeklerde ölümcül seyreden ve sistemik hastalığa sebep olan virulent suşları tanımlanmış (Decaro ve ark., 2005), bu yüksek virulense sahip varyant biyotip '**canine pantropik CoV**' olarak adlandırılmıştır. İtalya'da bir petshopta yavrularda ölümle seyreden bir enfeksiyon bildirimi sonrası bir köpeğin akciğer dokusundan immunohistokimyasal boyama aracılığı ile CCoV antijeni belirlenmiş ve gastrointestinal kanal dışında da pantropik CCoV'nin replike olabileceğine ilişkin ilk kanıtları ortaya koymuştur (Buonavoglia ve ark., 2006). Bu pantropik suşla (CB/05) yapılan çalışmalarda (Decaro ve ark., 2007), sistemik olarak iç organlarda dağılım gösterdiği, CCoV tip 2a virusları arasında sınıflandırıldığı, hafif/orta şiddetli CCoV'lardan farklı olarak CPV enfeksiyonuna benzer çeşitli klinik semptomlara (yüksek ateş, kanlı ishal, nörolojik bulgular ve lökopeni)

neden olduğu rapor edilmiştir (Decaro ve ark., 2008b). Pantropik CCoV'nin en belirgin özelliği enterik formdan farklı olarak iç organlara tropizm göstermesi ve uzun süreli lökopenidir. Çeşitli organlardan elde edilen pantropik CCoV'ye ait viral RNA'nın varlığı, birçok çalışmada yer almıştır (Buonovoglia ve ark., 2006; Zappulli ve ark., 2008; Decaro ve ark., 2008b). Bu organlar arasında; akciğer, karaciğer, lenf nodülleri, dalak, böbrek, idrar kesesi ve beyin bulunmaktadır (Decaro ve ark., 2008b; Decaro ve ark., 2012). Pantropik viruslarla enfeksiyonda dokularda tespit edilen yüksek seviyedeki viral RNA'ya rağmen virus izolasyonu genellikle başarısızdır (Ntafis ve ark., 2011, Decaro ve ark., 2012). Pantropik CCoV tip 2a'lar için genetik belirleyiciler halen tam olarak bilinmemektedir (Licitra ve ark., 2014).

CCoV'ların iki subtip ayrılması; TGEV/CCoV rekombinant suşlarının tespiti ile tanımlanmış olup, Klasik CCoV tip 2a suşları ve rekombinant CCoV tip 2b suşları klasifikasyonda yer almıştır (Pratelli ve ark., 2003c; Decaro ve ark., 2008b; Decaro ve ark., 2010). CCoV tip 2b suşlarında da sistemik yayılma gözlenebileceği, ancak bu durumun bugüne dek sadece CPV ile miks enfeksiyonları varlığında gerçekleştiği bildirilmiştir (Zapulli ve ark., 2008; Licitra ve ark., 2014). Ayrıca enterik CCoV ile pantropik CCoV suşları arasında kros bağışıklığın kısmi olarak söz konusu olduğu bildirilmiştir, zira enterik CCoV enfeksiyonu yönünden bağışık olan köpeklerde pantropik CCoV enfeksiyonlarına karşı enfeksiyon meydana geldiğinde seronegatif köpeklere göre klinik bulguların daha hafif olduğu gözlenmiştir (Decaro ve ark., 2009).

CCoV'ların evrimleşme sürecinde oluşan nokta mutasyonlar, küçük insersiyonlar ve delesyonların genomda kümeleşmesiyle, yeni bir biyotipin varlığından bahsetmek mümkün olmuştur. Böylelikle '**canine respiratorik CoV**' (CRCoV) tanımlanmıştır (Erles ve ark., 2003). Bu enfeksiyonla ilgili olarak; İngiltere'de yapılan bir retrospektif çalışmada 1971-2003 yılları arasında solunum sistemi bulgulu köpeklerden elde edilen doku

örneklerinden izole edilen viruslar arasında da respiratorik tipte CCoV varlığını göstermektedir (Ellis ve ark., 2005). Köpeklerde solunum sistemi enfeksiyonlu olgulardan alınan soluk borusu ve akciğer örneklerinden CRCoV izolasyonu yapılmıştır (Erles ve ark., 2007). Respiratorik CCoV'ların polimeraz ve S genleri sekans analizi sonuçları; betacoronaviruslarla yakın ilişkili olduklarını göstermiştir. Ayrıca Bovine CoV ve insan CoV cDNA polimeraz geni proteinleri ile yüksek aminoasit benzerliği gösterirken, aynı gen bölgesi yönünden enterik CCoV'lar ile sadece uzak bir ilişki içerisinde olduğu kanıtlanmıştır. Benzer bir çalışma spike proteininde de söz konusudur (Erles ve ark., 2003; Erles ve ark., 2007). Buna ek olarak *Betacoronavirus* üyelerinde karakteristik olan HE gen yapısının, CRCoV genomunda da bulunduğu kanıtlanmıştır (Erles ve ark., 2003). CRCoV; Kanada, Japonya ve Avrupa'nın diğer ülkelerinde de belirlenmiştir (Ellis ve ark., 2005; Yachi ve Mochizuki, 2006).

Betacoronavirus'ların evriminde, bu virusların ortak atadan geldikleri öne sürülmektedir. CRCoV'lar da, bu ortak atayı paylaşıyor olabilir ya da BCoV'ların türler arası nakil sonucu köpeklere geçişle meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Pratelli (2011); CRCoV'lerin nasıl ortaya çıktığına ilişkin sorulara cevap vermek için, eski yıllara ait benzer virusların test edilmesine ihtiyaç olduğunu ve CRCoV suşları ile filogenetik analizler yapılarak daha fazla sekans bilgisi elde edilmesi gerektiğini ifade etmektedir.

Enterik CCoV tip 1 ve tip 2'nin aksine, CRCoV'ler hafif dereceli solunum sistemi bulguları göstermekte ve canine solunum hastalıklarının etiyolojik ajanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Canine respiratorik sistem hastalıklarının diğer üyeleri olan *Bordetella bronchiseptica*, CAV tip 1 ve 2, canine parainfluenzavirus, canine herpesvirus, reoviruslar and influenzaviruslarının ayırıcı tanıda göz ardı edilmemesi gerekmektedir (Erles ve ark., 2004).

Serolojik kanıtlar, CCRCoV'nin Amerika Birleşik Devletleri, İrlanda, Yunanistan ve İtalya'da da sirküle olduğunu göstermiştir (Decaro ve ark., 2006a; Priestnall ve ark., 2006).

1.5. İmmunoloji

Köpeklerde zoner bir plasenta (placenta endothelio choralis desidua villosa zonaria) yapısı bulunmakta olup, maternal antikorların plasental yolla geçişi %5-10 oranda mümkündür (Pastoret ve ark., 1998). Hem transplasental hem de kolostral yolla alınan antikorlar, yavruları 6 hafta yüksek düzeyde korumakta; bununla birlikte 12 haftaya kadar da bağışık yanıt devam etmektedir. CCoV enfeksiyonuna karşı aşıli veya enfeksiyona maruziyet sonrası kazanılan antikorlar, anneden yavruya aktarılabilirler. Ancak genç köpeklerdeki maternal antikorlar sorgulanmaksızın yapılan aşılama sonucunda aşı başarısızlıklarına da rastlanmaktadır. Maternal antikor seviyesinin, aşılama ile sağlanan pasif immun yanıt üzerindeki etkisi nedeniyle düşen antikor seviyesinin takibi önem arz etmektedir. Bu nedenle CCoV'a karşı maternal antikor seviyesinin düşmeye başladığı 6 haftalık yaştan itibaren aşılama yapılması önerilmiştir (Licitra ve ark., 2014).

1.6. CCoV Enfeksiyonunun Tanısı

CCoV enfeksiyonunun tanısı amacıyla hastalık etkeninin ilk belirlendiği 1971 yılından bu zamana kadar birçok test geliştirilmiştir. Tanı; virolojik ve serolojik metotlar kullanılarak iki şekilde yapılmaktadır.

1.6.1. Direkt Tanı

1.6.1.1. Virus İzolasyonu ve Elektron Mikroskopi

Hücre kültüründen virus izolasyonu veya elektron mikroskopi (E.M.), köpeklerde CCoV enfeksiyonunun belirlenmesi için kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemlerin her ikisi de uzun süreç ve deneyim gerektiren ve rutin tanıda tercih edilmeyen metotlardır. Ayrıca E.M. her laboratuvarında bulunmamaktadır. Negatif boyama ve inceleme ile E.M.'de, dışkı numunelerindeki viral partiküllerin görüntülenmesi ile virus belirlenebilir. Ancak E.M.'de çoğu zaman CCoV'yi, CPV'den ayırmak zordur. Ayrıca klinik bulgulu hayvanlarda ticari kitler yardımıyla da enfeksiyonun tanısı yapılabilmektedir (Greene ve ark., 2012).

CCoV tip 1 izolatları, hücre kültürü sistemlerinde tek başına üretilmeyen defektif viruslardır. İn vivo koşullarda CCoV tip 1 virusları, CCoV tip 2'lerle birlikte "co-enfeksiyon" meydana getirebilirler (Licitra ve ark., 2014). İlk izole edilen CCoV suşu '1-71'; günümüzde CCoV tip 2 olarak klasifiye edilmiştir (Binn ve ark., 1974, Keenan ve ark., 1976). CCoV tip 2 virusları (1-71 gibi) hücre kültürlerinde (örneğin A-72 canine tümör fibroblast hücreleri) sitopatolojik etki oluşturarak üremeye elverişlidirler. Ayrıca 1-71 suşu, birçok feline hücre hattında da üretilmiş olmakla birlikte, ilginç olarak virus izolasyonu çalışmalarında diğer birçok canine hücre hattı kullanıldığında üreme gözlenmemiştir (Regan ve ark., 2012).

1.6.1.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler

CCoV enfeksiyonunun nekropsi materyalinde tanısı amacıyla immunohistokimyasal metodlardan immunofluoresans tekniği kullanılarak doku bölümlerinin boyanması yoluyla virusun belirlenmesi

hedeflenmektedir (Evermann ve ark., 2005). Bu metot, uygun ekipman ve deneyim gerektirmektedir.

1.6.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Dizin Analizi

CCoV enfeksiyonunun belirlenmesinde, yüksek spesifite ve sensitivite nedeniyle PCR kullanılması gerekliliği rapor edilmiştir (Decaro ve ark. 2004). Bu metot sayesinde E.M. ve virus izolasyonu tekniklerine kıyasla istenilen sonuca daha hızlı ulaşıldığı bildirilmiştir (Pratelli ve ark., 1999b).

Akut gastroenteritisli canlı hayvanlarda CCoV enfeksiyonunun tanısında hızlı teşhis imkanını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli testler sıklıkla kullanılmaktadır. Serotip ve genotip karakterizasyonu, hem PCR hem de dizin analizi yardımıyla yapılabilmektedir. Ayrıca CCoV oldukça değişken olan genomları nedeniyle ortaya çıkan birçok yeni varyant, bu yaklaşım ile saptanabilmektedir (Pratelli ve ark., 1999a).

1.6.2. Serolojik Tanı

CCoV antikorlarının varlığını belirlemek amacıyla ELISA, Virus Nötralizasyon Testi (VNT), Western-Blot testleri kullanılmaktadır.

ELISA testi, CCoV antikorlarını belirlemek için virus nötralizasyon testinden daha hızlı ve daha duyarlı bir testtir (Athanssious, 1994; Pratelli ve ark., 2002a). Ancak ELISA, CCoV'un serolojik tanısında kullanılabilirken, bu metotla günümüzde serotip ve genotip ayrımı yapılamamaktadır (Ellia ve ark., 2003). Hatta indirekt ELISA testi ile enfeksiyonun akut veya kronik oluşu hakkında yorum yapabilmek de mümkün olabilmektedir. Bu bağlamda ELISA, CCoV'e karşı oluşan

immunglobulin M (IgM) ve IgG'lerin sorgulamasına imkan tanımaktadır (Pratelli ve ark., 2002a).

CCoV spesifik antikorların belirlenmesi amacıyla VNT rutin uygulamalarda önem arz etmektedir, ancak uzun zaman alması (en az 4 gün), her laboratuvarında kullanılamaması ve sensitivitesinin düşük olması sebebiyle günümüzde rutinde tercih edilmemektedir (Pratelli ve ark., 2002b). Ayrıca yapılan çalışmalarda, ELISA ve Western-Blot testi tüm viral proteinlere karşı oluşan antikorların tespitini yapabilmekteyken, VNT yalnızca nötralizan antikorların tespitini yapabilmektedir. İmmunolojik statünün belirlenmesindeki sensitivitesinin düşüklüğü nedeniyle VNT, epidemiyolojik taramalarda ve aşı çalışmalarında hatalı sonuçlara neden olmaktadır. Bütün bu avantajları nedeniyle ELISA testinin VNT yerine kullanılmasının daha uygun olacağı, ayrıca viral proteinlerin belirlenmesinde sensitivite ve spesifitesi yüksek olan Western Blot ile kombine edilmesinin uygun olacağı ifade edilmektedir (Pratelli ve ark., 2002b).

Bu çalışmada; Türkiye'de sağlıklı görünümlü ya da klinik bulgulu evcil köpeklerde CCoV enfeksiyonunun M ve S gen bölgeleri hedef alınarak RT-PCR ile tanısı, enfeksiyonun yaygınlığı ve seçili örneklerde aynı gen bölgelerine ait dizin analizi yardımıyla sirküle olan virusların moleküler temelli araştırılmasını takiben, tüm dünyada evcil ve yabani köpeklerden izole edilen CoV'lar ile genetik yakınlıklarının sorgulanması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar yardımıyla ülkemizdeki CCoV enfeksiyonları hakkında epidemiyolojik bilgilere ulaşılmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada, 2012-2013 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri ve özel veteriner kliniklerinden Viroloji Anabilim Dalı'na rutin tanı amaçlı gönderilen sağlıklı görünümlü ya da klinik bulgulu (Resim 2.1) (ateş, durgunluk, diyare, vb.) 100 köpekten alınan kan ve rektal sürüntü örnekleri ile bunlardan ishalleri bir köpeğin nasal sürüntü kullanıldı (Ek 2).



Resim 2.1. A.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalındaki CCoV pozitif belirlenen köpeğe ait görüntü

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

2.2.1.1. Kan Örneklerinin Hazırlanması

Virolojik teşhis amacıyla EDTA (Ethylene diamine tetra-acetic asit) içeren vakumlu tüplere (Vacuette, Kat no: 455036/ A040409, Greiner, Almanya) en az 0,5 ml miktarda alınan kan örnekleri 4⁰C'de 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma atılarak lökosit tabakasından pipet yardımıyla 400µl steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı. Porsiyonlanan örnekler ekstraksiyon öncesine kadar -80⁰C' de muhafaza edildi.

2.2.1.2. Rektal Sürüntü Örneklerinin Hazırlanması

Selüloz fiber kaplı ticari sürüntü çubukları (Cultiplast-LP, İtalya) aracılığıyla toplanan 100 rektal ve 1 adet nasal sürüntü örneğine, içerisinde 25000 U/ml Penisilin ve 20 mg/ml Streptomisin bulunan 2 ml Fosfat Tampon Tuz Solusyonu (PBS) ilave edildi ve vorteks (karıştırıcı) yardımıyla karıştırıldı. Tüp içerisindeki sürüntü çubukları kenarda sıkılarak uzaklaştırıldı ve yaklaşık 2 ml sıvı, steril tüplere alınarak 4⁰C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda nükleik asit varlığını araştırmak üzere 400µl RNAase bulunmayan steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınan süpernatant ekstraksiyon öncesine dek -80⁰C' de muhafaza edildi. Arta kalan miktar ise, steril tüpler içerisinde -80⁰C'de saklandı.

2.2.2. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Chomczynski ve Sacchi (1987) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak, CCoV enfeksiyonundan şüpheli ve sağlıklı görünümlü 100 hayvandan alınan kan ve rektal sürüntü örneklerine, CCoV nükleik asit varlığını araştırmak amacıyla RNA ekstraksiyonu yapıldı. Buna göre; buz içinde bulunan 1,5 ml'lik mikrosantrifüj ependorf tüplerine konulan 400µl'lik kan ve sürüntü örneklerinin üzerine eşit hacimde (400µl) solüsyon D eklenerek 10-15 saniye vortekslendi. Tüpe sırasıyla 300µl asit fenol, 300µl kloroform-izoamilalkol (49:1) ve 100µl 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklendi. Karışım, 10-15 saniye vortekslendikten sonra 12500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatanttan 700µl alınarak, buz üzerindeki temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine eşit hacimde -20°C'de soğutulmuş izopropil alkol eklenerek vortekslendi. Nükleik asit presipitasyonu için karışım -80°C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda donmuş olan karışım, oda ısısında eritilmesini takiben 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün içindeki karışım dikkatle aspire edildikten sonra, dibe çökmüş RNA peleti üzerine yıkama amaçlı 300µl %70'lik -20°C'de soğutulmuş etil alkol eklenip 3 dakika santrifüj yapıldı ve alkol dikkatle uzaklaştırılarak kalan alkolün uçurulması amacıyla tüpler 37°C'de kurutuldu. Kuruyan peletler 30µl deiyonize su (Applchem, Almanya) ile tekrar süspanse edildikten sonra, moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

2.2.3. Viral RNA'dan Reverz Transkriptaz enzimi (RT) Yardımıyla Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen viral RNA'nın revers transkripsiyonu amacıyla Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Lot: #K1622) kullanıldı. Yapılan karışımların içerikleri ve uygulanan ısı döngüleri Çizelge

2.1 ve 2.2’de verildi. Tüm bu işlemler için termal çevirici cihaz (Biometra, Almanya) kullanıldı.

Çizelge 2.1. RT reaksiyonu bileşenleri

1. KARIŞIM		
	Bileşenler	Miktar(µl)
1	RNA Ekstraktı	3 µl
2	Random Hexamer Primer (100 µM, 0,2 µg/µl)	0,5 µl
3	Nükleazdan ari su	3 µl
	Toplam Hacim	6,5 µl
2. KARIŞIM		
	Bileşenler	Miktar(µl)
1	5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl [pH 8,3] 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	2 µl
2	10mM dNTP Mix	1 µl
3	RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	0,5 µl
	Toplam Hacim	3,5 µl

Çizelge 2.2. RT reaksiyonu ısı döngüleri

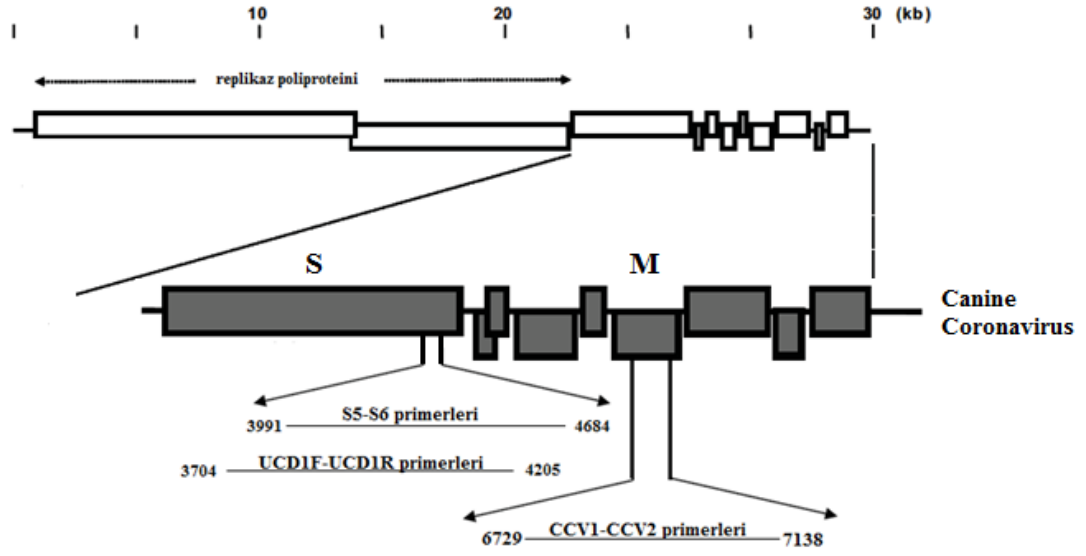
Sıra	Isı değeri(°C)	Zaman	Döngü Sayısı
1	70°C	5 dk	1
2	25°C	10 dk	1
3	37°C	60 dk	1
4	70°C	5 dk	1

2.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

CCoV enfeksiyonunun tanısı amacıyla CoV M geni seçilmiş olup, tüm kan ve rektal sürüntü örnekleri bu amaçla CCV1 ve CCV2 primerleri ile RT-PCR'a tabii tutuldu. Pozitiflik tespit edilen örnekler CoV S gen bölgesi yönünden dizin analizi yapabilmek amacıyla RT-PCR'a tabii tutuldu. İlgili ürünlerin elde edilmesi amacıyla, Çizelge 2.3'de bildirilen primerler kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan gen bölgeleri (Şekil 2.1) için PCR karışım bileşenleri ve PCR döngüsüne ait zaman/siklus bilgileri Çizelge 2.4'de gösterildi.

Çizelge 2.3. Kullanılan primer dizinleri

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizini (5'→3')	Gendeki Lokus	Ürün(bp)	Referans
M	CCV1	TCC AGA TAT GTA ATG TTC GG	6729-6748	409 bp	Pratelli ve ark., 1999a (D13096)
	CCV2	TCT GTT GAG TAA TCA CCA GCT	7138-7118		
S	UCD1F	CAG AAT GGG AAG AAG TGA CG	3704-3723	502 bp	Pratelli ve ark., 2003a (AB088222)
	UCD1R	CAC ACA TAC CAA GGC CAT TTT	4205-4185		
S	S5	TGC ATT TGT GTC TCA GAC TT	3991-4010	694 bp	Pratelli ve ark., 2004b (D13096)
	S6	CCA AGG CCA TTT TAC ATA AG	4684-4665		



Şekil 2.1. Kullanılan primerlerin genler üzerindeki yerleri

Çizelge 2.4. PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon	Kullanılan Program
Taq DNA polymerase (5u/µl)	0,25 µl	
10 X Taq buffer (tampon)	3,0 µl	
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	95 ⁰ C'de 5 dk
10 mM dNTP mix	0,5 µl	94 ⁰ C'de 1 dk
Primer- forward (10 pmol/µl)	0,5 µl	(*) ⁰ C'de 1 dk
Primer- reverse (10 pmol/µl)	0,5 µl	72 ⁰ C'de 2 dk
Deiyonize su	19,85 µl	72 ⁰ C'de 10 dk
cDNA	3,0 µl	
Toplam	30 µl	

(*): Farklı PCR uygulamalarında kullanılan annealing dereceleri primer çiftlerine göre farklılık göstermekte olup, CCV1-2 için 50⁰C, UCD1F-R için 52⁰C, S5-6 için 54⁰C olarak belirlenmiştir.

2.2.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla %1'lik agaroz (Prona, EU) jel, TAE (Tris Asetat Ethylene) tamponu içerisinde ısı yardımıyla eritildi. Eritilen jel üzerine 0,5µg/ml konsantrasyonundaki ethidium bromide (Sigma, ABD) ilave edilerek, önceden hazırlanan jel tarakları yerleştirilmiş olan jel taşıyıcısına bu karışım döküldü. Donmak üzere çeker ocak altında 10 dk bekletilen agarozdan taraklar çıkarılıp, elektroforez için TAE tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi. PCR ürünleri, yükleme boyası (6x Loading Dye, Fermentas, Litvanya) ile 1 kısım boyaya 4 kısım PCR ürünü olmak üzere karıştırılarak toplamda 5 µl karışım tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara pipet yardımıyla aktarıldı. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için 100 bp'lik merdiven (100 bp Marker, Fermentas, Litvanya, 1 kısım stok marker + 1 kısım yükleme boyası + 4 kısım su) başlangıçtaki tek kuyucuğa 1 µl olarak yüklendi. Daha sonra ürünler elektrik akımına tabi tutularak, yaklaşık 30 dk sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 100, ABD) kullanılarak amplikonlar görüntülendi.

2.2.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

M ve S gen bölgesi hedef alınarak yapılan konvansiyonel RT-PCR testinde pozitif olarak bulunan örneklerden pürifikasyon işlemi sırasında kaybolmayacağı öngörülen ve kalın banda sahip PCR ürünleri seçildi. PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla preparatif jel hazırlandı. Bu amaçla %1'lik agaroz jel ve geniş uçlu taraklar kullanıldı. 20 µl'den az olmamak üzere 4 kısım PCR ürünü ile 1 kısım 6x yükleme boyası bir parafilm üzerinde karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı. Jele 8 Volt/cm elektrik akımı uygulanarak 30 dakika süreyle DNA ürünlerinin ilerlemesi sağlandı. Elektroforez sonrasında transilluminatör yardımıyla görüntülenen jelde hedef gen ürünlerinin bulunduğu bantlar steril bir bistüri yardımıyla

jelden kesilerek ayrıldı ve 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere konuldu. Elde edilen jel parçalarına High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Almanya) kullanılarak, firma tarafından önerilen şekilde saflaştırma işlemi uygulandı. Bu prosedüre göre; kesilen jel ile eşit hacimde bağlanma solüsyonu (Binding Buffer) jelin bulunduğu tüpe konuldu. Tüp, 60°C'de 15 dakika jel tamamen eriyene kadar inkube edildi ve her 5 dakikada bir olmak üzere tüpler vortekslendi. Süre sonunda tüp içindeki sıvı, silika jel içeren tüplere aktarıldı. Bir dakika 10000 rpm'de santrifüj işlemi takiben tüpler, 700µl yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı. Tüpler boş olarak 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Silika jel tabakasında eser miktarda kalan etil alkolün tamamen uçması beklendikten sonra, boş ve temiz bir ependorf tüpe oturtulan silika jelli kısımlar üzerine 30 µl elüsyon solüsyonu veya RNAase-DNAase'dan arındırılmış su DNA'nın eldesi amacıyla ilave edildi. Tüplere 12000 rpm'de santrifüj işlemi uygulandı. İşlem sonunda elde edilen saflaştırılmış DNA'lar dizin analizinde kullanılmak üzere -20° C'de saklandı.

2.2.7. Dizin Analizi

Saflaştırılmış PCR ürünlerine, Dye Terminator Cycle Sequencing (Genomelab DTCS – Quick Start Kit, Kat No: S810148. Beckman Coulter) kiti kullanılarak (Çizelge 2.5) dizin analizi yapıldı. Boyalı nükleotidlerle işaretleme işlemi Çizelge 2.6'da gösterilen reaksiyon karışımı ve ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Isı döngü programı sonucunda elde edilen DNA'lar absolut ve %70 konsantrasyonda hazırlanmış etil alkol solusyonlarıyla yıkama işlemine tabi tutuldu. Bu işlemin ardından DNA'lar, etil alkolün uzaklaştırılması ve kuruması için karanlık bir ortamda bir gece bırakıldı. Ertesi gün işaretli ürünler, kapillar elektroforetik separasyon için Beckman Coulter CEQ 8000 Dizin Analizi cihazına (Beckman, ABD) yerleştirildi. Elde edilen veriler, üretici firma (Beckman-Coulter) tarafından sağlanan program (CEQ versiyon 5.0) ile değerlendirildi.

Çizelge 2.5. DTCS bileşenleri

DTCS Kit Karışımı	
Bileşen	Miktar (µl)
10X Reaksiyon Tamponu	2
dNTP Karışımı	1
ddUTP	1
ddGTP	2
ddCTP	2
ddATP	2
Toplam Hacim	11

Çizelge 2.6. DNA dizi analizi reaksiyonu bileşenleri ve ısı döngüsü

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı		Program ve Döngü Sayısı
Bileşen	Miktar (µl)	
DNA	4	96°C 'de 6 dk
Primer (Forward veya Reverse)	1	96°C 'de 20 sn
DTCS	4	50°C 'de 20 sn
Sulandırıcı	1	60°C 'de 4 dk
Toplam	10	4°C'de 10 dk

2.2.7.1. Dizin Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Dizin analizi sonrası elde edilen ham veriler, National Center Biotechnology Information (NCBI) servisinin Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) web sayfasında yer alan (BankIt: GenBank Submissions) programdan yararlanılarak analiz edildi. Dizinler Bioedit (Version 7.0.5.3)

ve Clustral W (Hall, 1999) yazılımı kullanılarak kendi aralarında karşılaştırıldı. Bu çalışmada elde edilen dizinler, aynı programın çoklu hizalama (multiple alignment) özelliğinden yararlanılarak, Gen Bankasından elde edilen referans viruslar ve diğer ülke suşları ile ilgili gen bölgeleri bakımından karşılaştırıldı.

2.2.7.2. Filogenetik Analiz

Filogenetik analizler; farklı ülkelerde sirküle olan diğer CCoV suşları ve aşı suşlarına ait dizinleri ile bu çalışmada elde edilen dizinler arasındaki genetik yakınlığın ortaya konulması amacıyla nükleik asit dizinleri baz alınarak yapıldı. Filogenetik analiz için MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software) (versiyon 6.0) (Tamura ve ark., 2013) programı kullanıldı. Bu amaçla fasta formatına çevrilen tüm verilere Neighbour-Joining metoduna göre bootstrap analizi (1000 replikasyon) yapıldı. Analizde Kiamura'nın 2'li parametresi kullanıldı ve bootstrap değerleri filogenetik harita üzerinde gösterildi.

2.2.7.3. İstatistiksel Yöntemler

Bu tez çalışmasında, hayvan sahiplerinden alınan bilgilere göre pozitiflik/negatiflik yönünden incelenerek, farklılıklar istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu amaçla Chi-Square, Fischer exact ve Student t testlerinden yararlanılmıştır. Tüm istatistiksel hesaplamalar minimum %5 hata payı ile incelenmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS 14.01 paket programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

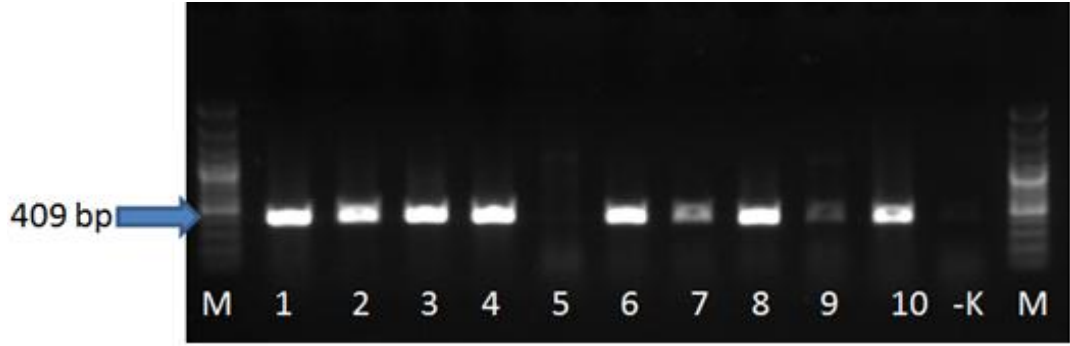
3.1. RT-PCR Bulguları

Bu tez çalışması için öngörülen 100 köpekten alınan kan ve rektal sürüntü örnekleri ile 1 nasal sürüntü örneği, RT-PCR ile CCoV enfeksiyonunun tanısı ve tiplendirilmesi amacıyla M ve S genleri yönünden araştırıldı. Kan örneklerinden 1 adedi M geni yönünden pozitiflik gösterirken, 99 kan örneği M geni yönünden negatif bulundu. Rektal sürüntü örneklerinde ise 100 adet sürüntü örneğinden RT-PCR ile 40 adedi (40/100, %40) M geni yönünden pozitif bulundu (Çizelge 3.1). M geni yönünden pozitif bulunan bu 40 rektal sürüntü örneği, dizin analizi yapılması amacıyla S genine yönelik iki farklı primer çifti ile RT-PCR'a tabii tutuldu. Pozitiflik veren 40 örnekten, FCoV-like CCoV'ları ayırt edebilen UCD-1 F-R primerleriyle 13'ü (%32,5), S5-6 primerleriyle ise 3'ü (%7,5) olmak üzere toplam 16 örnek S gen bölgesi yönünden pozitif reaksiyon verdi (Çizelge 3.1).

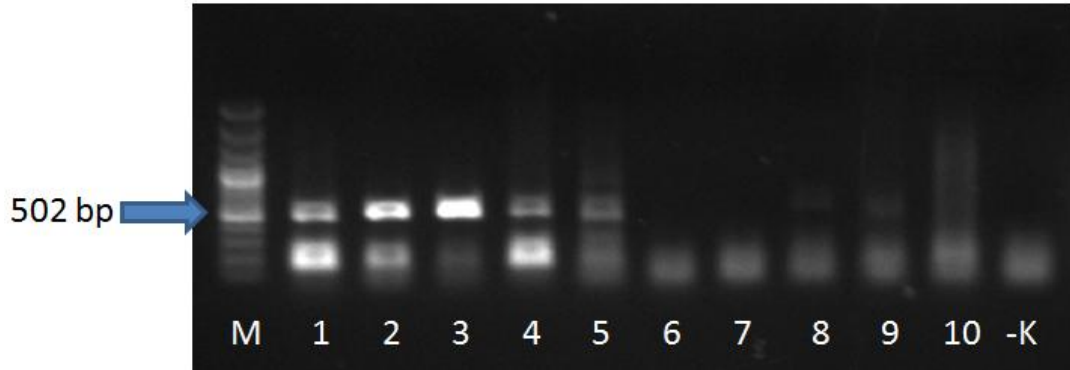
Çizelge 3.1. M ve S gen bölgeleri yönünden, örneklerin RT-PCR sonuçları

Gen Bölgesi	Primerler	Örnek Sayısı	Pozitif	Negatif
M Geni	CCV 1-2	100	40	60
S Geni	UCD1 F-R	40	13	27
S Geni	S5- S6	40	3	37

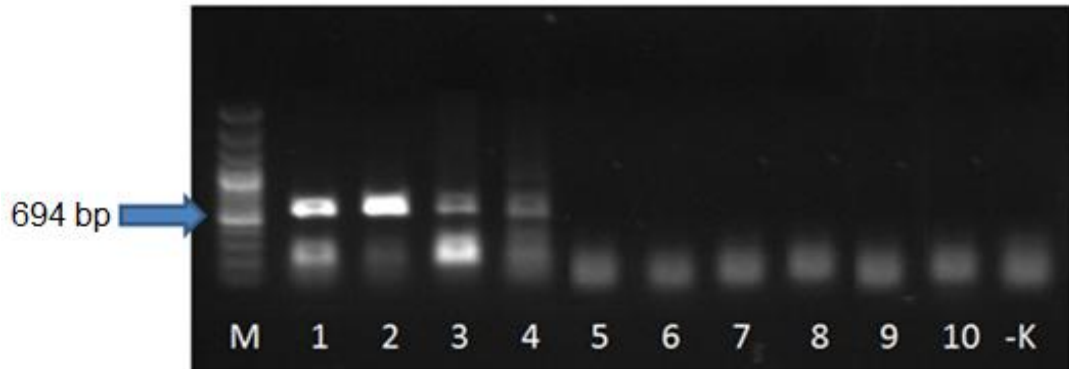
Bu çalışmadaki örneklerle CCoV M (409 bp) ve S (502 bp ve 694 bp) genleri hedef alınarak uygulanan RT-PCR sonucunda, hedeflenen büyüklükte ürün oluşumuna ait amplikonlar Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de sunuldu.



Şekil 3.1. CCoV M gen bölgesine ait agar jel elektroforez görüntüsü
M: Merdiven (100 bp'lik), 1: Pozitif Kontrol, 2-10: Örnekler, -K: Negatif Kontrol



Şekil 3.2. CCoV S gen bölgesine (UCD1 F ve R primerleri ile) ait agar jel elektroforez görüntüsü. M: Merdiven (100 bp'lik), 1: Pozitif Kontrol, 2-10: Örnekler, -K: Negatif Kontrol



Şekil 3.3. CCoV S gen bölgesine (S5-S6 primerleri ile) ait agar jel elektroforez görüntüsü. M: Merdiven (100 bp'lik), 1: Pozitif Kontrol, 2-10: Örnekler, -K: Negatif Kontrol

3.1. RT-PCR Sonuçları ve Bireysel Verilerin (cinsiyet, yaş, vb) Değerlendirilmesi

Örneklenen köpeklerin sahiplerinden alınan bilgilere göre; cinsiyet, yaş, yaşam koşulları (indoor/outdoor), barınma koşulları (tekli/çoklu), aşı durumları, klinik bulgulu olup olmadıklarına dair veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Buna göre; çoklu yaşam ortamında olan köpeklerin, tekli yaşam ortamındaki köpeklere göre daha çok FCoV-like CCoV enfeksiyonuna yakalandığı (13/40) ve bu durumun istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($p=0,034$).

Örneklenen 100 hayvandan 26 adedinde herhangi klinik bulgu bildirimi bulunmamakla birlikte, asemptomatik olan bu hayvanlardan 10 adedi RT-PCR ile CCoV nükleik asiti yönünden pozitif bulunmuştur. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada, CCoV enfeksiyonunun tanısında klinik bulguların önemi göz ardı edilmemekle birlikte, pozitiflik açısından RT-PCR bulguları baz alınarak enfeksiyonun epidemiyolojisine ilişkin değerlendirmelerin yapılması uygun görülmüştür. Bu noktada yapılan analizlerde; cinsiyet ($p=0,867$), klinik bulgu varlığı ($p=0,852$) ve aşı durumu ($p=0,764$) özellikleri açısından istatistiksel olarak RT-PCR sonucu pozitif hayvanları öne çıkarak herhangi bir anlamlı farklılık bulunamadı. Klinik bulgu gösteren hayvanların diğer enteropatojen ajanlar (CDV, CPV, bakteriyel, protozoer vb.) yönünden de pozitif olabileceği ihtimali düşünüldü.

Hayvanların yaşlarının 3 aydan küçük ya da büyük olmaları ile RT-PCR sonuçları analiz edildiğinde; M gen bölgesi primerleri ile ≤ 3 ay yaşta olan hayvanlarda CCoV enfeksiyonu sıklığı %92,5 (37/40) olarak tespit edildi. Yaş ve RT-PCR pozitifliği, Ki-kare testi ile sorgulandığında istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0,022$). Ayrıca S gen bölgesi primerleri ile FCoV-like CCoV enfeksiyonu varlığı yönünden yapılan analiz sonuçlarına göre; RT-PCR ile pozitif bulunan hayvanların yaş ortalaması

1,9 ay olarak belirlendi ve bu durum student t testi ile incelenerek istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p=0,001$).

Yaşama koşulları bakımından M gen bölgesi primerleri ile CCoV pozitifliği açısından yapılan analizde ise dışarı bağlantısı olan (outdoor) hayvanlarda, sadece evde beslenenlere (indoor) oranla daha fazla enfeksiyon varlığı saptanmış olup (38/40, %95), bu durum istatistiksel açıdan da anlamlı bulundu ($p=0,034$).

Çizelge 3.2. RT-PCR sonuçlarının bireysel verilere göre dağılımı

Veriler (n=100)		Sayı	M gen bölgesi pozitif	M gen bölgesi negatif	S gen bölgesi UCD1 F-R pozitif	S gen bölgesi UCD1 F-R negatif	S gen bölgesi S5-S6 pozitif	S gen bölgesi S5-S6 negatif
Cinsiyet	Erkek	61	24	37	7	19	2	23
	Dişi	39	16	23	6	8	1	14
Yaş	0-3 ay	85	37	47	13	25	3	22
	>3 ay	15	2	13	0	2	0	15
Yaşam Koşulları	Indoor	14	2	12	1	2	1	2
	Outdoor	86	38	48	12	25	2	35
Barınma Koşulları	Tekli	36	13	23	0	13	1	12
	Çoklu	64	27	37	13	14	2	25
Aşı Durumu	Aşılı	21	9	12	0	10	0	10
	Aşısız	79	31	48	13	17	3	27
Klinik Bulgu	Var	74	30	44	9	21	3	27
	Yok	26	10	16	4	6	0	10

3.2. Dizin Analizi Sonuçları ve Filogenetik Değerlendirme

CCoV'ların M ve S gen bölgeleri yönünden pozitif bulunan 9 örnek seçilerek dizin analizleri yapılmıştır. Bu 9 örneğin tümü M geni yönünden dizin analizine tabii tutulabilirken, S geni yönünden dizin analizine alınabilen örnekler; serotip tayininde kullanılan UCD1 F-R primerleri ile

reaksiyon verenler arasından seçilen 6 adet ve S5-6 primerleri ile reaksiyon verenler arasından seçilen 3 adettir (Çizelge 3.2).

Dizin analizi yapılan 9 örnekten biri olan 99 nolu örnek solunum yolu enfeksiyonu belirtileri bulunan bir köpeğe aittir. Bu köpekte solunum yolu enfeksiyonu belirtileri de bulunduğundan rektal sürüntü yanı sıra nazal sürüntü örneği de alınmış olup, RT-PCR ile pozitif bulunan bu nazal sürüntü örneği de dizin analizine dahil edilmiştir.

Dizin analizleri yapılan ve filogenetik ağaçtaki yerleri belirlenen 9 adet örneğe ait bireysel veriler değerlendirildiğinde, tümünün aşısız olduğu ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,001$). Dizin analizi yapılan bu 9 örneğin sadece birinde klinik bulgu görülmediği, diğer 8 örneğin alındığı köpeklerde ise gastrointestinal sisteme ait klinik bulgu (ishal ve ayrıca 1 köpekte nasal akıntı) gözlemlendiği tespit edildi. İshal semptomunun CCoV enfeksiyonlarının klinik tanısında önemli bir ayıracı olduğu ve hayvanların klinik durumlarının örneklerin seçimi açısından istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi ($p<0,001$).

Dizin analizine alınan 9 örnekteki cinsiyet, yaş, indoor/outdoor olma durumları, yaşama koşulları gibi kriterlerin herhangi bir önem arz etmediği ve istatistiksel olarak da bu durumun enfeksiyonun varlığı yönünden anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,001$).

Çizelge 3.3. M ve S gen bölgelerine göre RT-PCR sonuçları ve örneklerin CCoV tipleri

No	Cinsiyet	Yaş (ay)	Aşı Durumu	Semptom	Indoor/ outdoor	Yaşama Koşulları	CCV1- CCV2	UCD1F- UCD1R	S5-S6	CCoV Tipi
8	erkek	2	aşısız	Sağlıklı	Outdoor	çoklu	P	P	N	Tip 1
10	erkek	3	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	P	N	Tip 1
13	dişi	2	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	P	N	Tip 1
17	erkek	3	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	P	N	Tip 1
40	erkek	2	aşısız	İshal	Indoor	tekli	P	P	N	Tip 1
83	erkek	3	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	N	P	Tip 2
99**	dişi	2	aşısız	İshal	Indoor	tekli	P	N	P	Tip 2
100	dişi	2	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	P	N	Tip 1
101	erkek	3	aşısız	İshal	Outdoor	çoklu	P	N	P	Tip 2

P= Pozitif, N=Negatif

** Rektal ve nasal sürüntü örnekleri bulunmaktadır.

3.2.1. M Gen Bölgesine Göre Değerlendirme

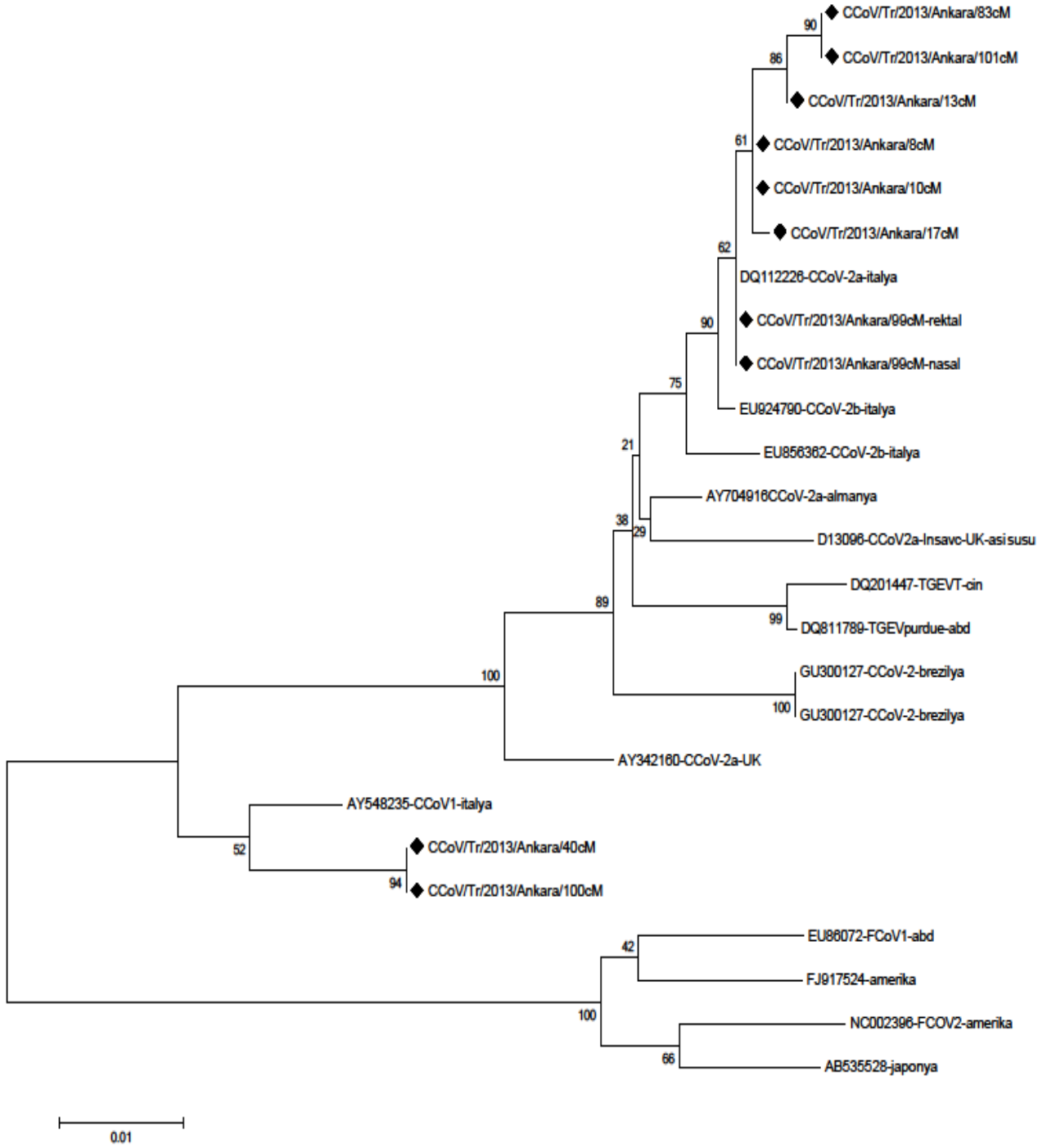
Dizin analizi yapılan 9 hayvana ait toplam 10 örneğin (99 nolu hayvana ait nasal sürüntü örneği de dahil) tümü CCoV olarak tespit edildi. CCoV pozitif olduğu belirlenen bu örneklerin M gen bölgesi yönünden filogenetik analizi sonucunda, birbirleri arasında %87,3- %100 oranında homolojileri olduğu ve İtalya'dan izole edilen suşlara oldukça yakın oldukları (%88,2-%99,4) belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Rektal ve nasal sürüntü örneklerinin alındığı 99 nolu hayvana ait M gen bölgesi dizinlerinin birbirleri ile % 100 homoloji gösterdiği belirlenmiştir

(Şekil 3.5). Bu bağlamda, aynı bireyden elde edilen iki dizinin aynı virusa ait olduğu kanaatine varılmıştır.

Aminoasit farklılıkları yönünden yapılan değerlendirmede 40 ve 100 no'lu örneklerin filogenetik analizde kullanılan diğer suşlarla karşılaştırıldığında 127. aa'de I (*Izolösin*)→A (*Alanin*), 173. aa'da V (*Valin*)→T (*Treonin*), 200. aa'da D (*Aspartik asit*)→E (*Glutamik asit*), 201. aa'da N (*Asparagin*)→H (*Histidin*), 223. aa'da K (*Lizin*)→Q (*Glutamin*) şeklinde değişimleri belirlenmiştir (Şekil 3.6). Söz konusu bu aa değişimleri İtalya'dan CCoV tip 1 suşları ile ve Japonya ile Amerika'daki FCoV suşları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu iki örneğin M gen bölgesi yönünden aminoasit değişimleri de aynı olmakla beraber %100 homolog oldukları tespit edildi.

Geri kalan 6 hayvana ait örneklerin M gen bölgesi yönünden dizinlerinin aa karşılaştırmalarında İtalya'da tespit edilen ve CCoV tip 2 olduğu belirlenen suşlarla %100 homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. M gen bölgesine yönelik 'neighbour-joining' analizi

127.aa (A değişimi)

173.aa (T değişimi)

		*	20	*	40	*	60
AY704916-CCoV-2a-almanya	:	FILWIMYFIRSIQLYRRTKSWWSFNPETNAILCVSALGRSYVLPLEGVPTGVTLTLLSGNLYAEG					
D13096-CCoV-2a-Insavc-UK-a	:	S.....C...					
DQ201447-TGEV-cin	:	G.....					
DQ811789-TGEVpurdue-abd	:						
GU300127-CCoV-2-brezilya	:	N.....					
GU300127-CCoV-2-brezilya	:	N.....					
AY34216-0CCoV-2a-UK	:						
EU86072-FCoV1-abd	:	A.C.....N.....D.T.....					
FJ917524-amerika	:	A.....N.....D.T.....					
NC002396-FCOV-2-amerika	:	A.....N.....D.T.....					
AB535528-japonya	:	A.....N.....D.T.....					
EU856362-CCoV-2b-italya	:						
EU924790-CCoV-2b-italya	:						
DQ112226-CCoV-2a-italya	:						
AY548235-CCoV-1-italya	:	A.....T.....					
CCoV/Tr/2013/Ankara/40cM	:	A.....T.....					
CCoV/Tr/2013/Ankara/100cM	:	A.....T.....					
CCoV/Tr/2013/Ankara/8cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/10cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/17cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/83cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/101cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/13cM	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-n	:						
CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-r	:						

Şekil 3.6. M gen bölgesine yönelik (CCV1-CCV2 primerleri ile) protein hizalamaları

	200-201.aa (EH değişimi)	223.aa (Q değişimi)
	80	100
AY704916-CCoV-2a-almanya	: AEGFKIAGGMNIDNLPKYVMVALPSRTIVYTLVGKKLFASSA	: 104
D13096-CCoV-2a-Insavc-UK-a	: V.....	: 104
DQ201447-TGEV-cin	:	: 104
DQ811789-TGEVpurdue-abd	:	: 104
GU300127-CCoV-2-brezilya	:	: 104
GU300127-CCoV-2-brezilya	:	: 104
AY34216-CCoV-2a-UK	:	: 104
EU86072-FCoV1-abd	: T.EH.....T.....	: 104
FJ917524-amerika	: T.H.....T.....	: 104
NC002396-FCCV-2-amerika	: T.EH.....T.....	: 104
AB535528-japonya	: T.EH.....T.....	: 104
EU856362-CCoV-2b-italya	:	: 104
EU924790-CCoV-2b-italya	:	: 104
DQ112226-CCoV-2a-italya	:	: 104
AY548235-CCoV-1-italya	: EH.....	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/40cM	: EH.....	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/100cM	: EH.....	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/8cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/10cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/17cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/83cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/101cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/13cM	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-n	:	: 104
CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-r	:	: 104

Şekil 3.6. Devam M gen bölgesine yönelik (CCV1-CCV2 primerleri ile) protein hizalamaları

3.2.2. S Gen Bölgesine Göre Değerlendirme

3.2.2.1. UCD1 Primerleri Kullanılarak Yapılan Değerlendirme

CCoV enfeksiyonu S gen bölgesine yönelik olarak kullanılan UCD1 F-R primerleri ile FCoV-like CCoV enfeksiyonu pozitif bulunan 6 adet örnek, CCoV tip I olarak adlandırılmışlardır. Bu örneklerin dünyadaki hem cinsleri ile yapılan filogenetik analiz sonuçları Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Bu dizinlerin elde edildiği suşlar Canine CoV tip I olmakla birlikte, Feline kökenli CoV'ların ayırımında kullanılan primerlerle reaksiyon vermiş olması dikkat çekici bulunmuştur. Ayrıca bu dizinlerin İtalya'daki köpeklerden izole edilen suşlara da oldukça yakın oldukları gözlenmiştir. Diğer CCoV ile bu 6 dizine ait nükleotid benzerlikleri %80 ile %96,1 arasında iken, bu benzerlik birbirleri ile %90,7 ile %95,1 arasında bulunmuştur (Şekil 3.7). Bu suşlara ait aminoasit karşılaştırmalarında (Şekil 3.9), dünyada sirküle olan diğer CCoV suşlarına göre gösterdikleri farklılıklar şekil üzerinde kırmızı ile işaretlenmiştir.

Aminoasit farklılıkları yönünden yapılan değerlendirmede 8, 17, 13, 10, 40 ve 100 no'lu örneklerin dizinleri filogenetik analizde kullanılan diğer suşlarla karşılaştırıldığında 1257. aa'de H (*Histidin*)→ S (*Serin*), 1264. aa'de (yalnızca 10 no'lu örnekte) G (*Glisin*)→D (*Aspartik asit*), 1297. aa'da M (*Metiyonin*)→T (*Treonin*), 1317. aa'de A (*Alanin*)→S (*Serin*), 1324. aa'de N (*Asparagin*)→S (*Serin*), 1355. aa'de Q (*Glutamin*)→V (*Valin*), 1362. aa'de T (*Treonin*)→ V (*Valin*), 1366. aa'de E (*Glutamik asit*)→ N (*Asparagin*) şeklinde değişimler belirlenmiştir (Şekil 3.9). Söz konusu bu aa değişimleri İtalya'daki CCoV tip I suşları ile benzerlik göstermektedir.

1257. aa'deki değişim, 40 no'lu örnek (H (*Histidin*)→L (*Lösin*)) hariç tüm örneklerde aynı şekilde gözlenmiştir. 1362. aa'de gözlenen değişim

ise 100 no'lu (T (*Treonin*))→ L (*Lösin*)) örnek hariç tüm örneklerde aynı şekilde gözlenmiştir.

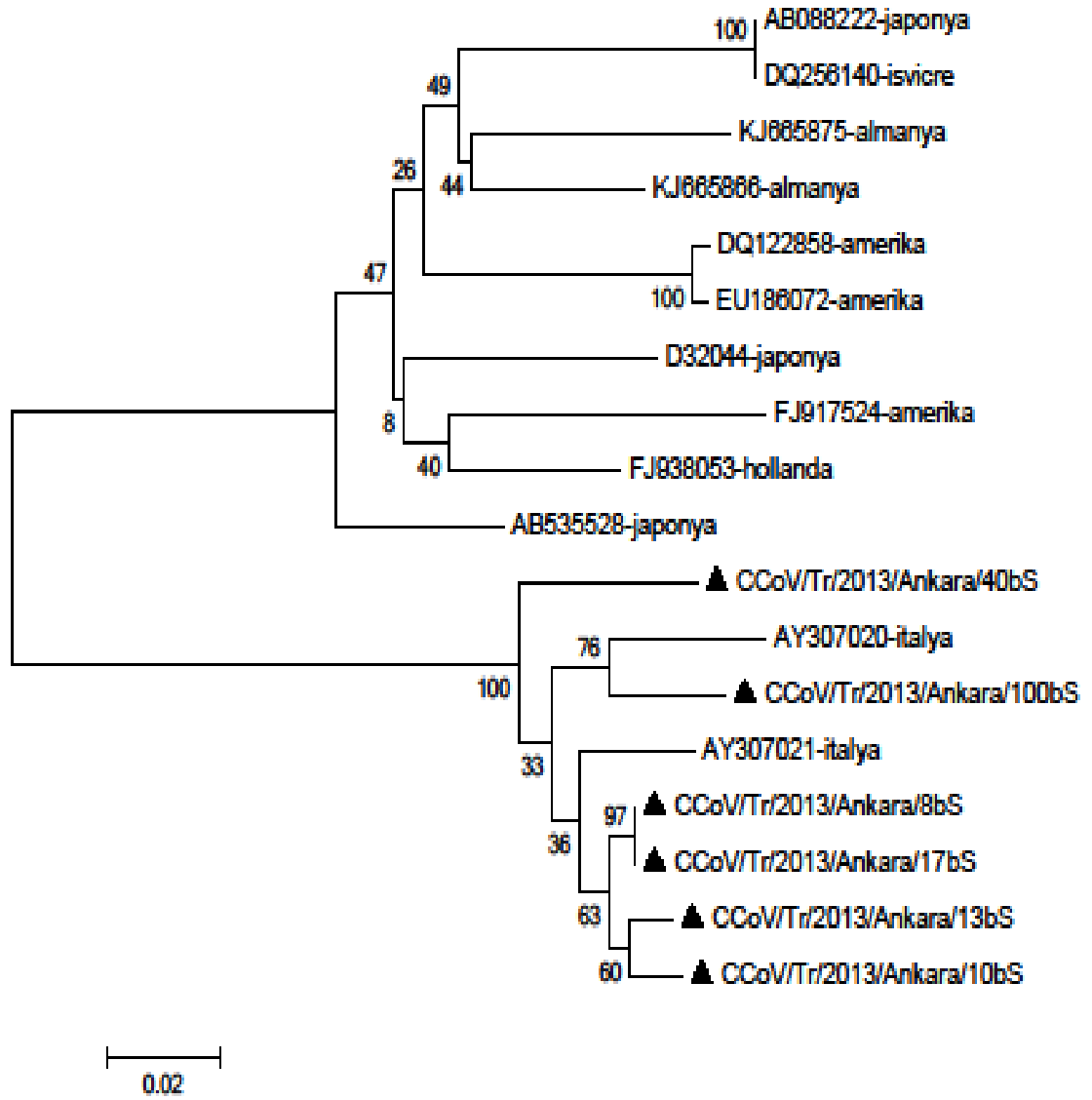
1329-1337.aa'ler arasında ise tek bir aminoasit değişimi değil, blok halinde bir değişim belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. S gen bölgesindeki aminoasit değişimleri

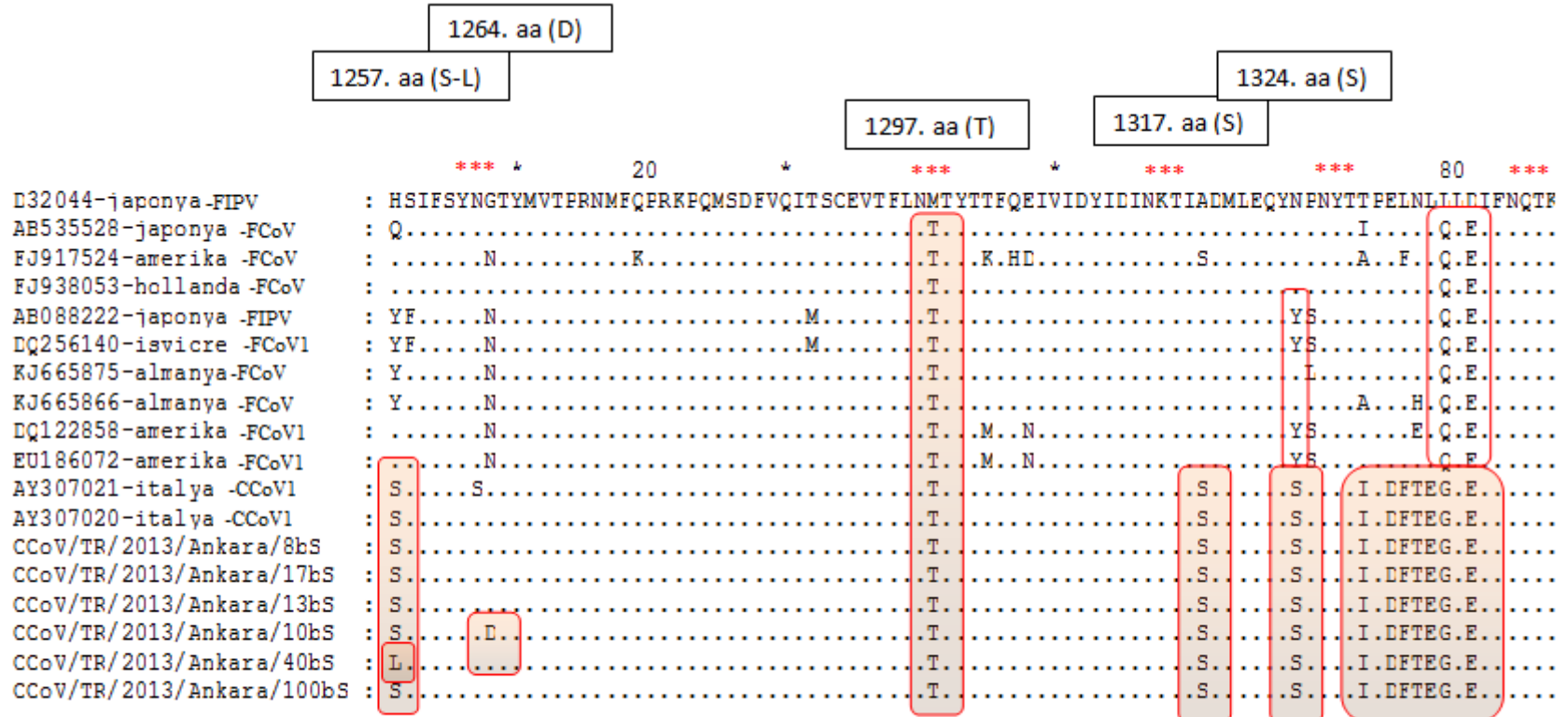
1329. aa	1331. aa	1332. aa	1333. aa	1334. aa	1335. aa	1337. aa
<i>Treonin</i> (T)	<i>Glutamik asit</i> (E)	<i>Lösin</i> (L)	<i>Asparagin</i> (N)	<i>Lösin</i> (L)	<i>Lösin</i> (L)	<i>Aspartik asit</i> (D)
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>İzolösin</i> (I)	<i>Aspartik asit</i> (D)	<i>Fenilalanin</i> (F)	<i>Treonin</i> (T)	<i>Glutamik asit</i> (E)	<i>Glisin</i> (G)	<i>Glutamik asit</i> (E)

		Percent Identity																			
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
	1		92.9	94.6	95.1	90.7	90.7	96.1	92.9	80.2	80.0	80.4	80.4	80.7	80.4	81.2	82.4	80.4	81.9	1	10UCD
	2	1.8		89.7	90.2	90.7	90.7	90.7	88.5	75.6	75.3	76.0	76.0	76.5	75.6	77.0	78.2	75.6	76.3	2	13UCD
	3	5.0	5.2		95.6	88.0	88.0	93.9	91.9	80.7	80.4	80.4	80.4	80.9	80.9	81.4	82.4	80.9	82.2	3	AY307020-italya
	4	4.5	4.6	4.7		88.3	88.3	94.9	93.2	81.4	81.2	80.7	80.7	80.9	81.2	82.2	83.1	80.4	82.4	4	100UCD
	5	2.0	1.4	5.5	5.2		100.0	90.2	89.0	75.1	75.1	75.6	75.6	76.3	74.8	76.5	78.0	75.6	76.5	5	8UCD
	6	2.0	1.4	5.5	5.2	0.0		90.2	89.0	75.1	75.1	75.6	75.6	76.3	74.8	76.5	78.0	75.6	76.5	6	17UCD
	7	3.4	4.0	6.7	5.6	2.8	2.8		94.1	80.9	80.7	81.4	81.4	81.4	80.4	82.2	83.1	81.7	82.4	7	AY307021-italya
	8	6.5	6.7	7.9	6.5	5.5	5.5	5.4		78.7	78.5	79.7	79.7	80.4	79.5	81.2	83.1	79.2	79.5	8	40UCD
	9	23.2	23.6	23.5	22.4	23.0	23.0	23.1	25.2		99.8	90.5	90.5	90.5	89.0	90.5	90.0	91.2	91.9	9	AB088222-japonya
	10	23.3	23.6	23.5	22.4	23.0	23.0	23.2	25.3	0.0		90.2	90.2	90.2	88.8	90.2	89.7	91.0	91.7	10	DQ256140-isvicre
	11	22.8	22.8	23.8	23.4	22.3	22.3	22.4	23.8	10.7	10.7		99.5	91.0	90.5	91.7	91.0	89.7	91.0	11	DQ122858-amerika
	12	22.8	22.8	23.8	23.5	22.3	22.3	22.5	23.8	10.7	10.7	0.5		91.0	90.5	91.4	91.0	89.7	91.0	12	EU186072-amerika
	13	22.4	22.0	23.1	23.1	21.1	21.1	22.4	22.6	10.7	10.7	10.1	10.1		90.0	93.6	94.4	91.0	90.7	13	D32044-japonya
	14	22.8	23.5	23.1	22.7	23.4	23.4	23.9	24.2	12.4	12.5	10.7	10.7	11.2		92.2	90.2	89.5	91.2	14	FJ917524-amerika
	15	21.8	21.4	22.4	21.3	20.8	20.8	21.4	21.6	10.7	10.7	9.2	9.6	6.9	8.6		93.6	90.2	92.2	15	FJ938053-hollanda
	16	20.0	19.6	21.0	20.0	18.6	18.6	20.0	18.9	11.3	11.4	10.2	10.2	6.1	10.9	7.0		91.0	91.0	16	AB535528-japonya
	17	22.9	23.6	23.1	23.9	22.3	22.3	22.1	24.5	9.8	9.9	11.6	11.7	10.1	11.8	11.0	10.2		92.9	17	KJ665875-almanya
	18	20.7	22.4	21.3	21.0	20.7	20.7	21.1	24.2	8.9	9.0	10.1	10.1	10.4	9.7	8.6	10.1	7.8		18	KJ665866-almanya
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		

Şekil 3.7. S gen bölgesi (UCD1 F-R) yönünden nükleik asit “percent identity-divergence” tablosu



Şekil 3.8. S gen bölgesine yönelik (UCD1 F-R primerleri ile) 'neighbour-joining' analizi



Şekil 3.9. S gen bölgesine yönelik (UCD1 F-R primerleri ile) protein hizalamaları

1329-1337.aa

		1355. aa (V)		1366. aa (N)
		1362. aa (V-I)		
	***	100	***	*
D32044-japonya-FIPV	:LNLTAEIDQLEQRADNLTIAHELQCYIDNLNKT	:	121	
AB535528-japonya-FCoV	:.....G.....	:	121	
FJ917524-amerika-FCoV	:.....	:	121	
FJ938053-hollanda-FCoV	:.....N.....	:	121	
AB088222-japonya-FIPV	:.....N.....	:	121	
DQ256140-isvicre-FCoV1	:.....N.....	:	121	
KJ665875-almanya-FCoV	:.....K.....	:	121	
KJ665866-almanya-FCoV	:.....G.....N.....D.....	:	121	
DQ122858-amerika-FCoV1	:.....	:	121	
EU186072-amerika-FCoV1	:...F.....	:	121	
AY307021-italya-CCoV1	:.....V.....V.....N.....	:	121	
AY307020-italya-CCoV1	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/8bS	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/17bS	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/13bS	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/10bS	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/40bS	:.....V.....V.....N.....	:	121	
CCoV/TR/2013/Ankara/100bS	:.....V.....I.....N.....	:	121	

Şekil 3.9. Devam S gen bölgesine yönelik (UCD1 F-R primerleri ile) protein hizalamaları

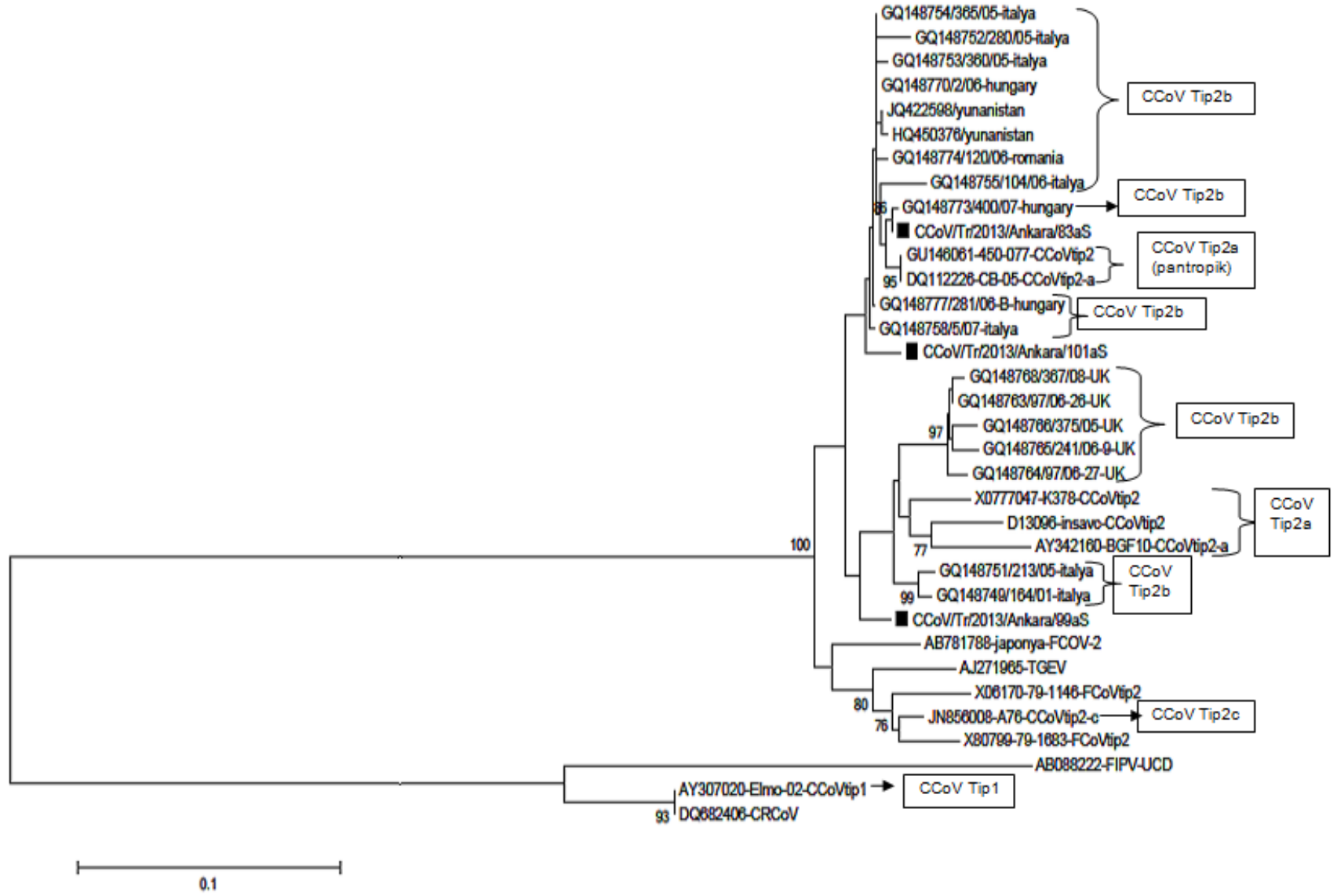
3.2.2.2. S5-S6 Primerleri Kullanılarak Yapılan Değerlendirme

CCoV enfeksiyonu S gen bölgesine yönelik olarak tip tayininde (CCoV tip 2) kullanılan S5-S6 primerleri ile pozitiflik 3 örnekte (3/40, %7,5) saptanmış olup, bu örnekler dizin analizine alındı. Filogenetik analiz sonuçları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

CCoV enfeksiyonu S gen bölgesine yönelik olarak kullanılan S5-S6 primerleri ile CCoV enfeksiyonu pozitif bulunan 3 adet örnek (83, 101 ve 99RS) CCoV tip 2 olarak belirlenmiştir. Bu örneklerin dünyadaki hem cinsleri ile yapılan filogenetik analiz sonuçları Şekil 3.11'te gösterilmiştir. Ayrıca S gen bölgesi yönünden birbirleri ile %86,2 ile %90,3 arasında homolojileri tespit edilmiştir. Elde edilen dizinler; diğer canine kökenli Macaristan, İtalya, İngiltere ve Romanya suşları ile S gen bölgesi nükleotid dizinleri yönünden karşılaştırıldığında %76-%87 arasında değişen oranda homoloji gösterdikleri, Yunanistan'dan elde edilen CCoV tip 2'ler ile de %91 oranında homolog oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.10). Bu çalışmada kullanılan Türkiye orijinli CCoV tip 2 suşlarının Japonya'dan elde edilen feline kökenli suşlara (FCoV tip 2), canine kökenli (CCoV tip 2) olanlardan daha fazla yakın olduğu ve %85,3-%91,7 oranında homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca Türkiye orijinli CCoV tip 2 suşlarının CCoV tip 1 referenz suşu olan Elmo02 ile %56,7-%62,7 arasındaki homoloji gösterdiği, aşı suşu e de sırasıyla %86,2 (99 nolu örnek), %86,5 (83 nolu örnek) ve %91,3 (103 nolu örnek) oranda homolog oldukları tespit edilmiştir.

Dünyada sirküle olan diğer CCoV suşlarıyla bu suşlara ait aminoasit karşılaştırmaları Şekil 3.12'da gösterilmiş olup, farklılıklar şekil üzerinde kırmızı ile işaretlenmiştir.

S gen bölgesi dizin analizlerinin dünyadaki diğer viruslarla aminoasit farklılıkları yönünden yapılan değerlendirmede 83, 101, 99 no'lu örneklerin diğer suşlarla karşılaştırıldığında 1223. aa'da G (*Glisin*)→ V (*Valin*), 1244. aa'de D (*Aspartik asit*)→ E (*Glutamik asit*), 1301. aa'da D (*Aspartik asit*)→E (*Glutamik asit*) şeklinde değişimleri belirlenmiştir (Şekil 3.12). Söz konusu bu aa değişimleri Macaristan'dan CCoV tip 2b suşları ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca 1223. ve 1301. aa'lardaki değişimlerin İtalya (CCoV 2a ve CCoV 2b) ve İngiltere (CCoV tip 2a) izolatlarında gözlenen aa değişimlerine benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. S gen bölgesine yönelik (S5-S6 primerleri ile) 'neighbour-joining' analizi

1301. aa (E)

	*	120	*	140	*	160	*
GQ148749/164/01-italya	:	QIEGCDVLFVNATVIDLPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPEL?~?LDIFNATYLNLTGEINDLEFRS	:	169			
JQ422598/yunanistan	:	E.....---	:	169			
HQ450376/yunanistan	:	E.....---	:	169			
GQ148754/365/05-italya	:	E.....---	:	169			
GQ148770/2/06-hungary	:	E.....---	:	169			
GQ148753/360/05-italya	:	E.....H.....---	:	169			
GQ148774/120/06-romania	:	E.....---	:	169			
GQ148752/280/05-italya	:	E.....---	:	169			
GQ148777/281/06-B-hungary	:	E.....---	:	169			
GQ148755/104/06-italya	:	E.....---	:	169			
DQ112226-CB-05-CCoVtip2-a	:	E.....---	:	169			
AY342160-BGF10-CCoVtip2-a	:	E.....---	:	169			
X0777047-K378-CCoVtip2	:	---	:	169			
GQ148765/241/06-9-UK	:	---	:	169			
GQ148766/375/05-UK	:	N.....---	:	169			
GQ148763/97/06-26-UK	:	---	:	169			
GQ148768/367/08-UK	:	---	:	169			
GQ148764/97/06-27-UK	:	E.....---	:	169			
GQ148751/213/05-italya	:	---	:	169			
AB781788-japonya-FCOV-2	:	E.....---	:	169			
AJ271965-TGEV	:	S.....--F.....	:	169			
JN856008-A76-CCoVtip2-c	:	---	:	169			
X06170-79-1146-FCoVtip2	:	F.....---	:	169			
X80799-79-1683-FCoVtip2	:	---	:	169			
AY307020-Elmo-02-CCoVtip1	:	..TS.E.T...T.YTTTFEE..I.....K..S...Q.S.....DFTEG.E...Q.K...A...E..V.A	:	167			
DQ682406-CRCoV	:	..TS.E.T...T.YTTTFEE..I.....K..S...Q.S.....DFTEG.E...Q.K...A...E..V.A	:	167			
AB088222-FIPV-UCD	:	..MS.E.T...T.YTTTQE..I.....K..A...Q.YS...T...DLQ.E...Q.K...A...Q..Q.A	:	167			
GQ148758/5/07-italya	:	E.....---	:	169			
D13096-insavc-CCoVtip2	:	G.....E.....---	:	169			
GU146061-450-077-CCoVtip2	:	E.....---	:	169			
GQ148773/400/07-hungary	:	E.....---	:	169			
CCoV/Tr/2013/Ankara/83aS	:	E.....---	:	169			
CCoV/Tr/2013/Ankara/101aS	:	E.....---	:	169			
CCoV/Tr/2013/Ankara/99aS	:	E.....---	:	161			

Şekil 3.12. Devam S gen bölgesine yönelik (S5-S6 primerleri ile) protein hizalamaları

4. TARTIŞMA

Köpekler; günümüzden yaklaşık 14.000 yıl öncesine dayanan evcilleştirme sonucunda gerek avcılık özelliklerinden ve gerekse iz sürme yeteneklerinden yararlanan dost canlısı hayvanlar olmuşlardır. Çatalhöyük'te bulunan neolitik dönemden kalma duvar resimlerinde M.Ö. 9000 yıllarına dayanan Anadolu'daki köpek evcilleştirmesine ait ilk belgelerden günümüze gelindiğinde, pet hayvancılığı olgusu giderek önem kazanmıştır. Dünyada 500 milyon üzerinde köpek popülasyonu varlığı bildirilmekte olup, köpek ve insanların yaşam birlikteliği hayvan sağlığı konularını da öne çıkarmıştır. Özellikle bulaşıcı viral enfeksiyonların hayvan sağlığı üzerine direkt etkileri yanı sıra, zoonoz potansiyellerinden dolayı insan sağlığını da etkileyecek olması, bu tip virusların araştırılmasını popüler hale getirmiştir.

Bu tez çalışmasına konu oluşturan CCoV enfeksiyonu bulaşıcı ve zoonoz potansiyeli olan gastrointestinal kanalda etkili viral hastalıklardan olup, bu çalışmada 100 adet köpeğe ait sürüntü ve kan örnekleri virolojik yönden incelenmiş ve RT-PCR aracılığıyla 40 adedinde (%40) CCoV nükleik asiti varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar CCoV enfeksiyonunun Türkiye'de varlığına dayalı ilk verilerle CCoV nükleik asit tespiti %15,5 (Yeşilbağ ve ark., 2004) karşılaştırıldığında, daha yüksek oranda enfeksiyon varlığını göstermektedir.

Dünyada köpeklerde CCoV enfeksiyonunun tekli/çoklu yaşam koşulları bakımından önemi ve görülme sıklığı hakkında farklı bildirimler bulunmaktadır (Naylor ve ark., 2002, Ntafis ve ark., 2013). Birçok araştırmacı tarafından kabul edilen genel görüş; CCoV enfeksiyonunun çoklu yaşam koşullarında naklinin oldukça kolay olduğu ve iki haftaya varan viremi ile saçılan virusun fekal-oral nakli ile yüksek bulaş

ihtimalinden dolayı birden fazla hayvanın aynı habitatı paylaştığı koşullarda, tekli yaşama koşullarına sahip hayvanlara göre daha sıklıkla CCoV enfeksiyonuna rastlanmasının mümkün olabileceği bildirilmektedir. Bu bağlamda; yukarıda anılan genel görüşe benzer olarak, bu tez çalışmasında çoklu yaşam koşullarında bulunan köpeklerde (27/40, %67,5) tekli yaşam koşullarındaki köpeklere (13/40, % 32,5) oranla daha fazla CCoV enfeksiyonu yönünden pozitiflik olduğu ve bu durumun Ki-kare testi aracılığıyla istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,034$). Bu çalışmada çoklu yaşam koşulu olarak birden fazla köpek ve/veya kedi barındırılması kastedilmekte olup, toplam 27 adet CCoV pozitif köpekten 14'ü köpeklerle çoklu yaşam ortamında bulundurulmaktayken, 13'ü kedilerle aynı habitatı paylaşmaktadır. Ayrıca kedilerle birlikte beslenen bu 13 köpeğin tümü feline CoV-like primerler ile pozitif tespit edilmiştir. CCoV tip 1 ile enfekte olduğu belirlenen bu 13 köpek kedilerle aynı habitatı paylaştığından enfeksiyon kaynağının kediler olabileceği konusu, Terada ve ark.'nın (2014) bildirdiği çalışma ile de benzerlik göstermektedir. Ayrıca, Licitra ve ark.'nın (2014) çalışmasında köpekler ve onlarla aynı ortamı paylaşan diğer türlerin, özellikle de kedilerin artışıyla; türler arası nakil sonucu novel rekombinant CoV'ların ortaya çıkma ihtimalinin de artış gösterdiği bildirilmektedir.

Bu çalışmada örneklenen köpeklerdeki enfeksiyonun yaş statüsü yönünden değerlendirilmesinde, CCoV M gen bölgesi primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonuçlarına göre 0-3 aylık yaş grubunda yer alan bireylerde enfeksiyonun sıklıkla görüldüğü (37/40, %92,5) ve bu durumun istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p=0,022$). Elde edilen sonuçlar, Ntafis ve ark. (2013) tarafından bildirilen verilerle ve Atasevan ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. Ayrıca S gen bölgesi sonuçları da enfeksiyon varlığının yaş ile bağlantılı olduğunu destekler niteliktedir ve istatistiksel açıdan bu sonuçlar da anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

Stavisky ve ark. (2012) İngiltere’de CCoV varlığı ve çevre şartları bağlantısını sorguladıkları çalışmaya göre, dış ortamla bağlantısı olan köpeklerde (outdoor) CCoV enfeksiyonun görülme sıklığının sadece evde yaşayan köpeklere (indoor) oranla daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında da dışarıyla bağlantılı olan köpeklerde (38/40), sadece evde yaşayan köpeklere oranla (2/40) daha fazla enfeksiyon varlığı saptanması önceki çalışmalarla paralellik arz etmekte olup, bu durum istatistiksel açıdan da anlamlı bulunmuştur ($p=0,034$).

Yeşilbağ ve ark. (2004) yaptığı çalışmada, klinik bulgu göstermeyen hayvanların tamamı CCoV enfeksiyonu yönünden RT-PCR ile negatif bulunurken, bu tez çalışmasında CCoV enfeksiyonu yönünden pozitif bulunan hayvanlardan %25’inin (10/40) klinik bulgu göstermeyen hayvanlar olduğu belirlenmiştir. Japonya’da yapılan bir çalışmada (Soma ve ark., 2011) ise, 109 köpekten alınan örneklerin 8’i RT-PCR ile CCoV nükleik asiti yönünden pozitif (%7,3) bulunmuş olup, bu 8 köpeğin ishal semptomlu olduğu belirtilmiştir. Erles ve Brownlie (2009) ise asemptomatik köpeklerde RT-PCR ile %12,5 CCoV pozitifliği belirlemişlerdir. Bu tez çalışması sonuçları, klinik bulgu gözlenmeyen köpeklerde de CCoV enfeksiyonunun varlığının mümkün olabileceğini göstermektedir.

CoV’nin tanısında RT-PCR tekniği kullanılarak M ve S gen bölgeleri üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Decaro ve ark., 2009; d’Alexandry ve ark., 2015). M gen bölgesi; korunaklı bir bölge olmasından kaynaklı enfeksiyonun varlığını belirlemede kullanılırken, S gen bölgesi; hücre tropizmi, konakçı spekturumunun belirlenmesi, nötralizan antikor oluşumu açısından önem arz etmekte olup, virusta meydana gelen değişimlerin belirlenmesinde de anahtar rol oynamaktadır (Lai ve ark. 2007). Bu tez çalışmasında, yukarıda söz edilen sebepler göz önünde bulundurularak, CCoV’nin M ve S gen bölgeleri hedef alınan primerler kullanılarak RT-PCR ile araştırma yapılmış olup, rutin tanı için M gen bölgesi yeterli bulunurken, tiplendirme ve filogenetik analizler için S gen bölgesi tercih edilmiştir.

Yeşilbağ ve ark. (2004, 2007) serolojik ve virolojik metotlara dayalı çalışmalarında CCoV enfeksiyonunun ülkemizde köpeklerde yaygın bulunduğunu ve yavru köpeklerde ishale neden olan önemli viral ajanlardan olduğunu bildirmiştir. Gür ve ark.'nın (2008) serolojik sonuçlara dayalı çalışmalarında örneklenen her yaştan tüm köpek ırklarında %96,5 oranında CCoV antikor varlığı tespit edilirken, yeni doğan köpeklerin bu enfeksiyona daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Atasevan ve ark. (2005) gençlerin CCoV enfeksiyonuna daha duyarlı olduğunu belirttiği çalışmada, %73,4 oranında CCoV antikor pozitiflik tespit etmiş ve cinsiyetler arasında enfeksiyonun pozitifliği açısından önemli bir farklılık bulunmadığını belirtmiştir. Bu tez çalışmasında, köpeklerde CCoV enfeksiyonu yönünden yapılan önceki çalışmalardan farklı olarak; RT-PCR ile pozitif bulunan örneklerden virus tipinin tayinini (CCoV tip 1/FCoV-like ve CCoV tip 2) takiben, CCoV M ve S gen bölgesi ürünlerinin dizin analizi ile bu bölgelerin moleküler karakterizasyonu sayesinde ülkemizdeki CCoV'larının dünyadaki hem cinslerine benzerlik ve farklılıklarının belirlenmesi sonucu sahada sirküle olan virusların özelliklerinin aydınlatılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RT-PCR sonuçları, ülkemizde CCoV tip 1 (13/40, %32,5) ve tip 2'nin (3/40, %7,5) varlığını göstermektedir. Tip spesifik primerler ile reaksiyon vermeyen örneklerin CCoV varyantı olabilecekleri ve tiplendirilemeyen bu örneklerin yeni dizayn edilecek primerler aracılığıyla tiplendirilebileceği düşünülmektedir. Yeşilbağ ve ark. (2007), CCoV aşısız köpeklerden aldıkları gaita örneklerinde CCoV nükleik asiti varlığını RT-PCR ile %15,5 oranda tespit etmiş olup, bu çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında 79'u aşısız 21'i aşılı köpeklerden alınan 100 örnekten 40'ı RT-PCR ile pozitif tespit edilmiştir. Pozitif olduğu belirlenen 40 hayvanın 31'i CCoV'a karşı aşısız 9'u aşılı köpeklerdir. Bu 40 CCoV pozitif hayvandan 0-3 ay yaşta bulunan 22'sine ait ayrıntılı verilere göre 14'ü kolostrumla beslenmeden yani annelerinden maternal antikor alamadan ayrılmışlardır. Bu tez çalışmasında serokonversiyon açısından herhangi bir değerlendirme olmamakla birlikte, sözkonusu bu hayvanların anket sorularından edinilen bilgilere göre maternal antikorları yeterince

bulundurmadıkları ve uygun dönemde aşılanmadıkları göz önünde bulundurulduğunda, bireylerin CCoV enfeksiyonuna açık halde oldukları düşünülmektedir. Postnatal hayatta CCoV ile karşılaştığı düşünülen bu bireylerde maternal antikor yetersizliğinin organizmayı enfeksiyona açık hale getiren predispoze faktörlerden biri olduğu kanaatine varılmıştır.

Bu çalışmada, dünya genelinde CCoV nükleik asiti varlığına dayalı PCR sonuçları yönünden yapılan taramalarda Türkiye, İtalya, Japonya, Amerika, İngiltere, Macaristan, Yunanistan, Çin, vb. ülkelerde %15,5-57,3 değişen oranlarda pozitiflik bildirimlerine (Soma ve ark., 2011) benzer oranda veriler elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmadaki veriler RT-PCR sonuçlarına göre değerlendirildiğinde CCoV tip 1'in ülkemizde köpeklerde daha sıklıkla görüldüğü ve immunizasyonda kullanılan aşılarda (Vanguard CV, Biocan C, Nobivac Corona) bulunan CCoV tipi (CCoV tip 2a) dikkate alındığında (Decaro ve ark., 2011a, Licitra ve ark., 2014), ülkemizdeki enfeksiyonun bu derece yaygınlığının şaşırtıcı olmadığı kanaatine varılmaktadır.

Bugüne dek enterik CCoV ile ilgili yapılan rutin tanı çalışmalarında kan örneklerinden ziyade, rektal sürüntü örneklerinin tercih edilme nedeni virusun affinite gösterdiği dokunun intestinal kanal olması (Pratelli, 2011) ve klinik bulgu olarak ishalin karakterisitk oluşuna bağlanmaktadır. Ayrıca apatojen olarak barsaklarda bulunan CCoV'ların sistemik enfeksiyona neden olabilmeleri için çeşitli faktörler (örneğin Canine Parvovirus koenfeksiyonu gibi) gerekmektedir (Decaro ve ark., 2009). Decaro ve ark. (2010) viral RNA'nın kanda her zaman tespit edilmesinin mümkün olamayacağını belirterek, bu durumu moleküler tekniklerle tespit edilemeyecek kadar düşük viremi düzeyine bağlamışlardır. Bu çalışmada; 100 adet kan örneğinin sadece 1 adedi (%1) CCoV nükleik asiti yönünden pozitif tespit edilmiş olup, rektal sürüntüsünün de pozitif olduğu belirlenen bu örnek zayıf amplikon oluşturduğundan dolayı dizin analizine alınamamıştır. Bu sonuç, Decaro ve ark.'nın (2008b) deneysel enfekte

edilen köpeklerde kanda viral RNA'yı tespit edemedikleri ve Decaro ve ark.'nın (2010), CCoV'un kanda viremi esnasında çok düşük seviyede olması ve kan numunelerinden çalışılmasının zor olduğuna değindiği çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Bu bağlamda doğal enfeksiyon sonucu oluşan CCoV tanısına yönelik çalışmalarda kan örneklerinden daha çok rektal sürüntü/gaita örneklerinin tercih edilmesinin gerektiği sonucuna varılmıştır.

CCoV enteropatojen viruslardan olup, sistemik enfeksiyonlara da yol açtıkları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında ishal ile birlikte üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları da gösteren 99 nolu köpeğe ait rektal ve nasal sürüntü örnekleri RT-PCR tekniği ile pozitif bulunmuş olup, dizin analizine tabii tutulmuşlardır. Filogenetik analiz sonuçlarına göre her iki dizinde birbirleriyle %100 homoloji göstermektedir. Yani bu bireyde hem gastrointestinal sistem hem de respiratorik sistem etkilenmiştir. Decaro ve ark.'nın (2009) deneysel enfeksiyon çalışmasında enfekte edilen yavru köpeklerin sadece gaitalarında virus saçılımı olduğu, ne kan ne de nasal sürüntü örneklerinde viral RNA'yı tespit edemedikleri bildirilmiş olup, bu tez çalışmasında nasal sürüntü örneğinden viral RNA'nın tespiti ilgi çekici bulunmuştur. Yukarıda bahsi geçen bulgular Decaro ve Buonavoglia'nın 2011 yılında yaptıkları çalışma bulguları ile paralel olup, sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Decaro ve Buonavoglia, 2011b).

RT-PCR sonuçları ile pozitif bulunan 40 köpeğe ait örnekler arasından dizin analizine seçilen 9'unun hayvan sahiplerinden edinilen veriler değerlendirildiğinde, seçilen tüm örneklerin aşısız hayvanlara ait olduğu ve 9 adet hayvanın 8'inin klinik bulgu gösterdiği belirlenmiştir. Bu durumun viral yükü arttırdığı kanaatine varılmış, ayrıca bu öngörü örneklerle ait ampikonların kuvvetli oluşları ile de desteklenmiştir. Dizin analizine alınan bu örneklerin ait olduğu bireylerin aşısız oluşları ve klinik bulgu göstermeleri istatistiksel olarak da anlamlı ($p < 0,001$) bulunmuş ve bu seçimi destekler niteliktedir.

Filogenetik analiz sonuçları dikkate alındığında M gen bölgesi yönünden 9 hayvana ait toplam 10 dizin analizi yapılmış olup, bu dizinlerden 8 adedi CCoV tip 2 virusları ile aynı dalda yer almıştır. Geri kalan 2 dizin ise CCoV tip 1 viruslarının bulunduğu dalda yerleşmiştir. Ancak bu 9 hayvana ait örneklerin genotiplendirilmesi S gen bölgesi primerleri ile mümkün olduğundan, bu primerler kullanılarak 3 adedi CCoV tip 2 ve 6 adedi CCoV tip 1 olarak belirlenmiştir. CCoV M gen bölgesi primerleri kullanılarak RT-PCR yöntemiyle pozitif bulunan iki dizin (40 ve 100 numaralı örnekler), referenz viruslarla karşılaştırıldığında aminoasit farklılıkları göstermiştir. Bu farklılıklardan 127. ve 223. aa'daki değişimler Amerika (Pedersen, 2009), Japonya (Terada ve ark., 2012), İtalya (Pratelli ve ark., 2004a) ve Latin Amerika'dan (Pinto ve ark., 2014) izole edilen CCoV'nin aynı numaralı aminoasitleri ile benzerlik göstermektedir. Sözü edilen 40 ve 100 nolu hayvanlara ait örnekler S gen bölgesine göre de CCoV tip 1 olarak adlandırılmışlardır. Costa ve ark. (2014) Brezilya'dan elde ettikleri CCoV ile yapmış oldukları çalışmada; 127., 173., 200. ve 201. aa'lardaki değişimlerin tespiti ile CCoV tip 1 ve CCoV tip 2 arasında ayırım yapılabileceği öne sürülmektedir. Bu anılan aa değişimleri, bu tez çalışmasındaki 40 ve 100 nolu örneklerle birebir benzerlik göstermekte olup, M geni yönünden yapılabilecek bir genotiplendirmenin hatalı olabileceği kanaatini de uyandırmaktadır. Çünkü Şekil 3.5'te kullanılan diğer ülke izolatlarındaki anılan numaralı aa'lerin değişimlerine bakıldığında; FCoV-1, FCoV-2 gibi izolatlarda da aynı aa değişimlerinin olabileceği görülmektedir. Zira genotiplendirmeye ilişkin çalışmalar günümüze yakın tarihte olup, bu non-synonim değişimler hakkındaki yorumlar henüz kesinleşmemiş olmakla birlikte, Avrupa'dan ve dünyadaki başka ülkelerden yapılan çalışmalarda da aynı konu üzerindeki tartışmalar devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, CCoV S gen bölgesine göre elde edilen dizin analizlerinin aminoasit açısından diğer referanslar ile karşılaştırılması yapıldığında; S gen bölgesi yönünden FCoV-like CCoV'lar (CCoV tip 1) ve

CCoV tip 2'lerin ayrımını yapan UCD1F-R primerleri ile pozitiflik veren örneklerin (6 adet) aminoasit değişiklikleri Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Buna göre 1297, 1317, 1324, 1355 ve 1366. aa'lerdeki değişim, 6 adet Türkiye orijinli CCoV tip 1 suşunda da söz konusu olmuştur. Bu tek aa değişimleri nokta mutasyonlar şeklinde olup, İtalya ve Brezilya suşlarındaki aynı numaralı aa'lerdeki değişimler ile benzerlik göstermektedir. Brezilya'dan elde edilen CCoV'ların S gen bölgesindeki bu değişimlerin tartışıldığı araştırmada (Costa ve ark., 2014); subtip, klinik bulgu/patojenite (pantropik) ve tek bir CCoV tipi ya da her iki CCoV tipi ile birlikte dual enfeksiyona yatkınlık noktasında belirleyici olabilecekleri ifade edilmekle birlikte, bu konuda kesin bir yargıya varılmadığı ve çalışmaların devam ettiği belirtilmiştir. Türkiye orijinli CCoV'larının anılan primerler kullanılarak S gen bölgesi analizlerinden elde edilen sonuçlar Brezilya'daki bu çalışma ile benzerlik göstermekte olup; 6 sekansın yapıldığı köpeğin aynı evde kedilerle beraber yaşamakta olduğu ve kedilerden herhangi CCoV pozitifliği araştırılmamış olmakla birlikte, bu köpeklerin türler arası nakil ile kedilerden CCoV'ları almış oldukları düşüncesi hakim olmuştur. Bu bağlamda, anılan aa değişimlerinin S gen bölgesi yönünden "rekombinasyon" konusunda da araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

CCoV tiplendirmesinde kullanılan S5-S6 primerleri ile dizin analizi yapılan 3 örnek, Macaristan, İtalya, İngiltere ve Romanya gibi Avrupa kökenli CCoV tip 2 suşları ile karşılaştırıldığında; 1223, 1244, 1301 nolu aa'lerde homolog değişimleri göstermiştir. Örneklenen hayvanlardan 83 nolu köpek, S5-S6 primerleri ile reaksiyon vererek dizin analizine alınmış olup, bu bölge yönünden Macaristan kökenli izolatlar ile 1244 nolu aa'deki farklılık nedeniyle aynı alt gruba dahil olmuştur. Tıpkı Macar CCoV'lar gibi tip 2b grubunda yer alan bu suş dışında, 99 ve 101 nolu köpeklere ait S gen bölgesi dizin analizleri de Macar ve İtalyan CCoV tip 2b suşları ile yakınlık göstermektedir. Ancak bu iki suş (99 ve 101) tek başlarına ayrı birer dalda yer almaktadır. Decaro ve ark. (2010) tarafından yapılan ve köpeklerde Avrupa ülkelerinde rekombinant CCoV'ın oldukça yaygın

bulunduğu çalışmada; CCoV enfeksiyonunda kullanılan aşıların CCoV tip 2a suşlarını içerdiği ve bunların CCoV tip 2b'ye karşı kullanımında kısmi zayıf kros reaksiyon verdiği ifade edilmektedir. Bu durumun köpeklerdeki rekombinant viruslara karşı oluşan immun yanıtı etkileyebileceğinden hareketle, bu tez çalışmasında tiplendirilen CCoV'ın sadece tip 2 b suşları oluşu nedeniyle ülkemizde de kısmi kros bağışıklığın olabileceği, ancak bu bağışıklığın yetersiz kalabileceği kanaatine varılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışma, 2012-2013 yılında örneklenen 100 adet köpeğe ait CoV enfeksiyonu yaygınlığını ve sirküle olan virusların moleküler karakterizasyon sonuçlarını içermektedir. Bu çalışmadaki verilere göre;

- CCoV enfeksiyonunun ülkemizdeki köpeklerde oldukça yaygın olduğu (%40) tespit edilmiştir.

- CCoV enfeksiyonun laboratuvar tanısında, rektal sürüntü örneklerinin hastalığın belirlenmesinde kullanılmasının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

- Köpeklerde yeni CCoV genotiplerinin ve patotiplerinin ortaya çıkması, yeni virulent suşları içeren aşılarda hazırlanması ihtiyacını doğurmaktadır. CCoV'lere karşı halen kullanılmakta olan inaktif aşılarda sirküle olan her iki alt tipi içermemesi sebebiyle yeterli etkiye sahip olmadığı düşünüldüğünde, bu tez çalışması ile ileride yapılacak deneysel çalışmalara basamak oluşturabilecek, ülkemizde CCoV enfeksiyonu ile aşı kullanımlı mücadele programlarının geliştirilmesine yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir.

- Çalışma sonucunda ülkemizde sirküle olan CCoV'lerin antijenik ve genetik özellikleri, yapılan dizin analizleri ile ortaya konularak, elde edilen filogenetik analiz sonuçlarına göre, bu virusların dünyada bulunan diğer CCoV'ler ile yakınlık-uzaklıkları belirlenmiştir. Buna göre; rutin tanıda M genine yönelik primerlerin kullanımı yeterli olmakla birlikte, dizin analizi yardımıyla yapılacak genotiplendirme çalışmalarında S genine yönelik ampikonların da araştırılması önerilmektedir.

- CCoV enfeksiyonuna maruz kalan ülkelerde kontrol ve eradikasyon programlarının geliştirilmesi adına öncelikle CCoV enfeksiyonlarına ait epidemiyolojik statünün bilinmesi gerekmektedir. Bu

Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile CCoV enfeksiyonunun ülkemizde hangi tiplerinin seyrettiği (CCoV tip1 ve CCoV tip 2b) belirlenerek, CCoV enfeksiyonuyla mücadele konusunda bilimsel yaklaşımda bulunulması sağlanmıştır. Bu tez çalışması sonuçlarına göre; lkemizde CCoV ile mücadele ve kontrol programlarında kullanılacak aşılarda tip 1 etkenleri yanı sıra tip 2 etkenlerinin de kombine olması önerilmektedir.

ÖZET

Evcil köpeklerde Canine Corona Virus (CCoV)'ların moleküler epidemiyolojisi

Bu çalışmada, evcil köpeklerin önemli hastalıklarından birine sebep olan Canine Coronavirus (CCoV) enfeksiyonlarının yaygınlığının araştırılması ve sahadaki suşların M ve S gen bölgesi hedef alınarak moleküler karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 100 köpek kullanıldı. Olgular yaş, ırk, cinsiyet, bakım ve besleme koşulları, aşıları olup olmama durumları ve klinik bulgular yönünden anket soruları eşliğinde değerlendirildi.

Bu veriler ışığında köpeklerde CCoV enfeksiyonlarının yaygın olduğu (%40), enfeksiyonun klinik bulgu, aşı durumu ya da cinsiyet ayrımı gözetmediği, evde ya da sokakta beslenen köpeklerin hepsinde enfeksiyonun görülebileceği ve CCoV enfeksiyonunda ishal bulgusunun sıklıkla gözlemlendiği ortaya konulmuştur.

Uygulanan RT-PCR sonucunda CCoV tanısında ve tiplendirilmesinde M primeri ile beraber S geni primerlerinin daha net sonuç verdiği belirlenmiştir. Dizin analizlerine göre Türkiye'de sirküle olan CCoV'lar dünyadaki diğer CCoV'lar ile benzerlik göstermiştir. Genotipik olarak; CCoV tip 1 ve CCoV tip 2 suşlarının varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Türkiye'de canine coronavirus enfeksiyonunun moleküler epidemiyolojinin belirlenmesi yönünde yapılacak çalışmaların devamlılık göstermesinin gerekli olduğu; bu çalışmaların ticari aşı tercihlerinin belirlenmesi ve aşı geliştirme yönündeki yeni çalışmalar için yol göstereceği ve sağlıklı pet hayvancılığı yönünden önemli katkılar sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Canine Coronavirus, Epidemiyoloji, Moleküler, Moleküler filogeni, RT-PCR

SUMMARY

Molecular Epidemiology of Canine Corona Viruses (CCoV) among domestic dogs

In this study, elucidating not only the prevalence of CCoV, important disease of dogs, but also molecular characterization of the viruses with M and S genes based RT-PCR and sequencing were aimed.

During this study 100 dogs were sampled. Dogs were grouped according to the information collected from the questionnaires filled by the owners on age, breed, gender, housing, environment and vaccination status.

These questionnaires revealed that CCoV infection was seen widespread in dog population (%40), diseases could be caused by virus regardless of clinical symptoms, vaccination status, gender and housing (indoor /outdoor). Diarrhoea is the common clinical symptom of CCoV.

The PCR results indicated that not only the M primers but also the S gene primers should be used in order to determine and genotyping of the CCoV. The sequence analysis pointed out the CCoV's (CCoV type 1 and 2) in Turkey, were genetically related to the other CCoV's worldwide.

As a result we concluded that studies for determining molecular epidemiology of canine coronaviruses must be continuous; and these studies will contribute to the choice of commercial vaccines and help new studies for developing vaccines and contribute to healthy animal in several ways.

Key words: Canine Coronavirus, Epidemiology, Molecular, Molecular phylogeny, RT-PCR

KAYNAKLAR

- ATASEVAN, V. S., UCAR, H., AKCA Y., (2005). Canine Coronavirus Antibodies in Stray Dogs. *Indian Vet. J.*, **82**: 782-783.
- ATHANSSIOUS, R., MARSOLAIS, G., ASSAF, R., DEA, S., DESCOTEAUX, J.P., DULUDE, S., MONTPETIT, C., (1994). Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. *Can. Vet. J.* **35**: 163-169.
- BEAUDETTE FR, HUDSON CB. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc*, **90**: 51-60.
- BELOUZARD, S., CHU, V.C., WHITTAKER, G.R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 5871-5876.
- BELOUZARD, S. MILLET, J.K., LICITRA, B.N., WHITTAKER, G.R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, **4**: 1011-1033.
- BENETKA, V., KOLODZIEJEK, J., WALK, K., RENNHOFFER, M., MÖSTL, K., (2006). M gene analysis of atypical strains of feline and canine coronavirus circulating in an Austrian animal shelter. *Vet. Rec.* **159**: 170-174.
- BINN, L. N., E. C. LAZAR, K.P. KEENAN, D. L. HUXSOLL, R.H. MARCHWICKI, A. J. STRANO. (1974). Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.* **78**: 359-366.
- BOSCH, B.J.; ROTTIER, P.J. (2008). Nidovirus Entry into Cells. In Nidoviruses; Perlman, S., Gallagher, T., Snijder, E.J., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, pp. 157-178.
- BUONAVOGLIA, C., DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., CAMPOLO, M., DESARIO, C., CASTAGNARO, M., TEMPESTA, M. (2006). Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**: 492-549.
- CASTANHEIRA, P., DUARTE, A., GIL, S., (2014). Molecular and serological surveillance of canine enteric viruses in stray dogs from Vila do Maio, Cape Verde. *BMC veterinary research* **10.1**: 91.
- CHEEVER FS, DANIELS JB, PAPPENHEIMER AM, BAILEY OT. (1949). *J Exp Med*; **90**: 181-194.

- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol –chloroform extraction. *Anal.Chem.*, **162**: 156-159.
- CONNOR, R.F. (2007), Roper Unique SARS-CoV protein nsp1: bioinformatics, biochemistry and potential effects on virulence. *Trends Microbiol.*, **15** (2) pp. 51.
- D'ALEXANDRY, A., DUARTE L., PAVIO N., S LE. (2015). Characterisation of different forms of the accessory gp3 canine coronavirus type I protein identified in cats. *Virus research*.
- DECARO N., BUONAVOGLIA C., (2008a): An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. *Veterinary Microbiology*, **132**: 221-234.
- DECARO N., DESARIO C., ELIA G., MARI V., LUCENTE M.S., CORDIOLI P., COLAIANNI M.L. MARTELLA V., BUONAVOGLIA C., (2006a): Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy, *Vet. Microbiol.*
- DECARO, N., BUONAVOGLIA, C. (2011). Canine coronavirus: not only an enteric pathogen." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **41.6** 1121-1132.
- DECARO, N., CAMPOLO, M., LORUSSO, A., DESARIO, C., MARI, V., COLAIANNI, M.L., ELIA, G., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., (2008b): Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. *Vet. Microbiol.*, **128**: 253–260.
- DECARO, N., CORDONNIER, N., DEMETER, Z., EGBERINK, H., ELIA, G., GRELLET, A., LE PODER, S., MARI, V., MARTELLA, V., NTAFIS, V., (2012). European surveillance for pantropic canine coronavirus. *J. Clin. Microbiol*, **51**: 83–88.
- DECARO, N., DESARIO, M. BILLI, M., (2011a): Western European epidemiological survey for parvovirus and coronavirus infections in dogs, *Veterinary Journal*, **187**, 2: 195–199.
- DECARO, N., ELIA, G., MARTELLA V. ET AL., (2010): Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain. *Vaccine*, **28**: 724-729.
- DECARO, N., MARI, V., CAMPOLO M. ET AL., (2009): Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of swine are circulating in dogs. *Journal of Virology*, **83**: 1532-1537.
- DECARO, N., MARTELLA, V., DESARIO, C., BELLACICCO, A.L., CAMERO, M., MANNA, L., D'ALOJA, D., BUONAVOGLIA, C., (2006b): First detection of

- canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **53**: 468-472.
- DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., CAMPOLO, M., DESARIO, C., CIRONE, F., TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, C., (2007): Molecular characterisation of the virulent canine coronavirus CB/05 strain. *Virus Res.*, **25**: 54–60.
- DECARO, N., MARTELLA, V., RICCI D., (2005): Genotype-specific fluorogenic RT-PCR assays for the detection and quantitation of canine coronavirus type I and type II RNA in faecal samples of dogs. *Journal of Virological Methods*, **130**(1-2): 72-78.
- DECARO, N. (2009): Thesis, Canine Coronaviruses: Epidemiology, evolution and pathobiology, ISBN: 978-90-393-5055-3.
- DOYLE, L.P., HUTCHINGS, L.M., (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **108**, 257-259.
- DROSTEN, C., S. GÜNTHER, W. PREISER, D. W. VAN, H. BRODT, S. BECKER, H. RABENAU, M. PANNING, L. KOLESNÍKOVA, R. A. M. Vermeulen. 2003. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *N.Engl.J. Med.* **348**: 1967-1976.
- DYE, C., TEMPERTON, N., SIDDELL, S.G., (2007): Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines. *J. Gen. Virol.*, **88**: 1753–1760.
- ELLIS, J.A., N. MCLEAN, R. HUPAELO, D.M., 2005: Haines, Detection of coronavirus in cases of tracheobronchitis in dogs: a retrospective study from 1971 to 2003 *Can. Vet. J.*, **46**: 447–448.
- ERLES, K. SHIU, K.-B., BROWNLIE, J., 2007: Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. *Virus Research*, **124**: 78–87.
- ERLES, K., DUBOVI, E.J., BROOKS, H.W., BROWNLIE, J., 2004: Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.*, **42**: 4524–4529.
- ERLES, K., TOOMEY, C., BROOKS, W., BROWNLIE, J., 2003: Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*, **310**: 216–223.
- ESCUTENAIRE, S., ISAKSSON, M., REN-STROM, L.H., KLINGEBORN, B., BUONAVOGLIA, C., BERG, M., BELAK, S., THOREN, P., 2007: Characterization of divergent and atypical canine coronaviruses from Sweden. *Arch. Virol.* **152**: 1507–1514.

- EVERMANN, J., ABBOTT, J.R., HAN, S., 2005: Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. *J. Vet. Diagn. Investig.* **17**: 610–614.
- GONZALEZ, J. M., GOMEZ-PUERTAS, P., CAVANAGH, D., GORBALENYA, A. E., AND ENJUANES, L., 2003: A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* **148**: 2207-35.
- GRAHAM, R.L., BARİC, R.S., 2010: Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* **84**: 3134–3146.
- GREENE, C.E.; DECARO, N., 2012: Canine Viral Enteritis in Infectious Diseases of the Dog and Cat. *Elsevier Saunders*.
- GUAN, Y., ZHENG, B. J., HE, Y. Q., 2003: Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science*, **302**, 5643: 276–278.
- GÜR S., CİVELEK T., 2007: Vaka Raporu: Bir köpek barınağında kanin coronavirus varlığının serolojik olarak araştırılması. *Vet. Bil. Derg.* , **21**(2): 103-106.
- GÜR, S., GENÇAY, A., DOĞAN, N., 2008: Serologic Investigation for Canine Corona Virus Infection in Individually Reared Dogs in Central Anatolia. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **5**: 67-71.
- HAGEMEIJER, M. C., 2011: Dynamics of the coronavirus replicative structures, Utrecht University Repository, ISBN: 978-90-393-5667-8.
- HAIJEMA, Feline coronaviruses: a tale of two-faced types Coronaviruses: *Molecular and Cellular Biology* sy: 184.
- HALL, TA, (1999). Nucleic acids symposium series - jwbrown.mbio.ncsu.edu.
- HASÖKSÜZ M, ALEKSEEV K, VLASOVA A, ZHANG X, SPIRO D, HALPIN R, WANG S, GHEDİN E, SAİF LJ. (2007). Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like Coronavirus isolated from a giraffe. *J Virol*; **81** (10): 4981-4990.
- HASÖKSÜZ M, VLASOVA A, SAİF LJ. (2008). Detection of Group 2a Coronaviruses with Emphasis on Bovine and Wild Ruminant Strains. In Cavanagh D, editor. SARS- and Other Coronaviruses. New York: Humana Press. pp. 43-59.
- HASÖKSÜZ, M., LATHROP, S., AL-DUBAİB, M.A., LEWIS, P., SAİF, L.J., (1999). Antigenic variation among Bovine Enteric Coronaviruses (BECV)

and Bovine Respiratory Coronaviruses BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch. Virol.*, **144**: 2441-2447.

HERREWEGH, A.A., SMEENK, I., HORZINEK, M.C., ROTTIER, P.J., DE GROOT, R.J., (1998). Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J. Virol.*, **72**: 4508-4514.

HOFMANN, H., PYRC, K., VAN DER HOEK, L., GEIER, M., BERKHOUT, B., POHLMANN, S., (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**: 7988-7993.

HOHDATSU, T., IZUMIYA, Y., YOKOYAMA, Y., KIDA, K., KOYAMA, H., 1998: Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Arch. Virol.*, **143**: 839-850.

HOLMES, K.V., LAI, M.M.C., 1996: Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, ve ark., editörler. *Fundamental Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers*, pp: 541-559.

HUANG, I.C., BOSCH, B.J., LI, F., LI, W., LEE, K.H., GHIRAN, S., VASILIEVA, N., DERMODY, T.S., HARRISON, S.C., DORMITZER, P.R., FARZAN, M., ROTTIER, P.J., CHOE, H., 2006: SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J Biol Chem.* **281**: 3198-3203.

JACKWOOD, M.W., (2006). The relationship of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with avian and other Coronaviruses. *Avian Dis.*, **50**: 315-320.

KEENAN, K.P., JERVIS, H.R., MARCHWICKI, R.H., BINN, L.N., 1976: Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: studies by virologic, histologic, histochemical, and immunofluorescent techniques. *Am. J. Vet. Res.* **37**: 247-256.

KREMPL, C., SCHULTZE, B., LAUDE, H., HERRLER, G., 1997: Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **71**: 3285-3287.

LAI MMC, PERLMAN S, ANDERSON LJ. 2007: Coronaviridae. In Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*. pp: 1305-1335.

LE PODER, S.; PHAM-HUNG D'ALEXANDRY D'ORANGIANI, A.L.; DUARTE, L.; FOURNIER, A.; HORHOGA, C.; PINHAS, C.; VABRET, A.; ELOIT, M. (2013). Infection of cats with atypical feline coronaviruses harbouring a

- truncated form of the canine type I non-structural ORF3 gene. *Infect. Genet. Evol.*, **20**, 488-494.
- LICITRA, B.N., MILLET, J.K., REGAN, A.D., HAMILTON, B.S., RINALDI, V., DUHAMEL, G.E., WHITTAKER, G.R. (2013). Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 1066-1073.
- LICITRA, BETH N., GERALD E. DUHAMEL, AND GARY R. WHITTAKER. (2014): "Canine Enteric Coronaviruses: Emerging Viral Pathogens with Distinct Recombinant Spike Proteins." *Viruses* **6.8**: 3363-3376.
- LIU DX, YUAN Q, LIAO Y. (2007). Coronavirus envelope protein: a small membrane protein with multiple functions. *Cell Mol Life Sci*; **64**(16): 2043-2048.
- LORUSSO, A., DECARO, N., SCHELLEN, P., ROTTIER, P.J., BUONAVOGLIA, C., HAÏJEMA, B.J., DE GROOT, R.J. (2008). Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J. Virol.* **82**: 10312–10317.
- MADU, I.G., ROTH, S.L., BELOUZARD, S., WHITTAKER, G.R. (2009). Characterization of a highly conserved domain within the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein S2 domain with characteristics of a viral fusion peptide. *J. Virol.*, **83**: 7411–7421.
- MASTERS, P.S., PERLMAN, S. (2013). Coronaviridae. In *Fields Virology*, 6th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA; pp. 825–858.
- NARAYANANA KRISHNA, SYDNEY I. RAMIREZB, KUMARI G. LOKUGAMAGEA, 2, SHINJI MAKINOA, Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression 2014.
- NASH TC, BUCHMEIER MJ (1997). Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways. *Virology*, **233**: 1-8.
- NAYLOR, MATTHEW J., CHARANJIV S. WALIA, STEVEN MCORIST, PHILIP R. LEHRBACH ELIZABETH M. DEANE4 AND GAVAN A. HARRISON (2002). Molecular Characterization Confirms the Presence of a Divergent Strain of Canine Coronavirus (UWSMN-1) in Australia .
- NEUMAN BW, ADAIR BD, YOSHIOKA C, QUISPE JD, ORCA G, KUHN P, MILLIGAN RA, YEAGER M, BUCHMEIER MJ (2006). Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy. *J Virol* **80**: 7918-7928.

- NTAFIS, V., MARI, V., DECARO, N., PAPANASTASSOPOULOU, M., PAPAIOANNOU, N., MPATZIOU, R., BUONAVOGLIA, C., XYLOURI, E. (2011). Isolation, tissue distribution and molecular characterization of two recombinant canine coronavirus strains. *Vet. Microbiol.*, **151**: 238-244.
- NTAFIS, VASILEIOS, ET AL. (2013). Canine coronavirus, Greece. Molecular analysis and genetic diversity characterization. *Infection, Genetics and Evolution* **16**: 129-136.
- PASTORET, P. P., GRIEBEL, P., BAZIN, H., GOVAERTS, A. (EDS.). (1998). Handbook of vertebrate immunology. Academic Press.
- PEDERSEN, N.C., (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection:1963–2008. *J. Feline Med. Surg.* **11**: 225-258.
- PINTO, L. D., BARROS, I. N., BUDASZEWSKI, R. F., WEBER, M. N., MATA, H., ANTUNES, J. R., CANAL, C. W. (2014). Characterization of pantropic canine coronavirus from Brazil. *The Veterinary Journal*, **202**(3), 659-662.
- PRATELLI A., 2011: The evolutionary processes of canine coronaviruses. Hindawi Publishing Corporation Advances in Virology, DOI:10.1155/2011/562831
- PRATELLI A., ELIA, G., MARTELLA V., (2002). M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs,” *Veterinary Record*, **151**(25): 758-761.
- PRATELLI A., MARTELLA V., DECARO N., 2003 a: Genetic diversity of a canine coronavirus detected in pups with diarrhoea in Italy, *Journal of Virological Methods*, **110**: 9-17.
- PRATELLI A., TINELLI A., DECARO N., 2002: PCR assay for the detection and the identification of atypical canine coronavirus in dogs. *Journal of Virological Methods*, **106**: 209-213.
- PRATELLI, A. TINELLI, N. DECARO, F. CIRONE, G. ELIA, S. ROPERTO, M. TEMPESTA, C. BUONAVOGLIA (2003b). Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups *N. Microbiol* **26**:151–155.
- PRATELLI, A. TINELLI, N. DECARO, V. MARTELLA, M. CAMERO, M. TEMPESTA, M. MARTINI, L.E. CARMICHAEL, C. BUONAVOGLIA (2004), Safety and efficacy of a modified-live canine coronavirus vaccine in dogs *Vet. Microbiol.*, **99**: 43–49.
- PRATELLI, A., DECARO, N., TINELLI A., 2004: Two genotypes of canine coronavirus simultaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(4): 1797–1799.

- PRATELLÌ, A., MARTELLA, V., ELÌA, G., DECARO, N., ALÌBERTÌ, A., BUONAVOGLÌA, D., TEMPESTA, M., BUONAVOGLÌA, C., 2001: Variation of the sequence in the gene encoding for transmembrane protein M of canin coronavirus (CCV). *Mol. Cell Probes*, **15**: 229–233.
- PRATELLÌ, A., MARTELLA, V., PISTELLO M. ET AL., 2003c: Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *Journal of Virological Methods*, **107**: 213–222.
- PRATELLÌ, A., TEMPESTA, M., GRECO, G., MARTELLA, V., BUONAVOGLÌA, C. 1999. Development of a nested PCR for the detection of canine coronavirus. *J. Virol. Meth.* **80**: 11-15.
- PRATELLÌ, A., TEMPESTA, M., ROPERTO, F.P., SAGAZÌO, P., CARMÌCHAE, L., BUONAVOGLÌA, (1999). C. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. *J. Vet. Diagn. Investig.* **11**: 550–553.
- PRIESTNALL, S.L. J. BROWNLÌE, E.J. DUBOVÌ, K. ERLES, (2006). Serological prevalence of canine respiratory coronavirus *Vet. Microbiol.*, **115**: 43-53.
- REGAN, A.D., MÌLLET, J.K., TSE, L.P., CHÌLLAG, Z., RÌNALDÌ, V.D., LÌCÌTRA, B.N., DUBOVÌ, E.J., TOWN, C.D., WHÌTTAKER, G.R. (2012). Characterization of a recombinant canine coronavirus with a distinct receptor-binding (S1) domain. *Virology*, **430**, 90–99.
- REGAN, A.D., OUSTEROUT, D.G., WHÌTTAKER, G.R. (2010). Feline lectin activity is critical for the cellular entry of feline infectious peritonitis virus. *J. Virol.* **84**: 7917–7921.
- REGAN, A.D., WHÌTTAKER, G.R. (2008). Utilization of DC-SIGN for entry of feline coronaviruses into host cells. *J. Virol.* **82**: 11992–11996.
- RÌSCO C, ANTON IM, ENJUANES L, CARRASCOSA JL (1996). The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol*, **70**: 4773-4777.
- Sanchez-Morgado JM, Poynter S, Morris TH (2004). Molecular characterization of a virulent canine coronavirus BGF strain. *Virus Res* **104**: 27–31.
- SCHULTZE, B., KREMPL, C., BALLESTEROS, M.L., SHAW, L., SCHAUER, R., ENJUANES, L., HERRLER, G. (1996). Transmissible Gastroenteritis Coronavirus, but Not the Related Porcine Respiratory Coronavirus, Has a Sialic Acid (N-Glycolylneuraminic Acid) Binding Activity? *J. Virol.*, **70**: 5634–5637.
- SÌDDEL SG, ZÌEBUHR J, SNÌJDER EJ. Coronaviruses, Toroviruses and Arteriviruses. In Mahy BW, ter Muelen V, editors. Topley & Wilson's

- Microbiology and Microbial Infections. 10th ed. London: ASM Press; 2005. pp. 823-856.
- SOMA, T., T. OHNATA, H. ISHII, T. TAKAHASHI, S. TAHARAGUCHI, M. HARA, (2011). "Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan," *Research in Veterinary Science*, **90**(2): 205–207.
- SPAAN W, CAVANAGH D, HORZINEK MC. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol*, **69**: 2939-2952.
- STAVISKY, JENNY, ET AL. (2012): Cross sectional and longitudinal surveys of canine enteric coronavirus infection in kennelled dogs: A molecular marker for biosecurity." *Infection, genetics and evolution* **12**(7): 1419-1426.
- STAVISKY, JG. L. PINCHBECK, A. J. GERMAN ET AL., (2010). Prevalence of canine enteric coronavirus in a cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices," *Veterinary Microbiology*, **140**(1-2): 18-24.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30**(12): 2725-2729.
- TENNANT, J., GASKELL, R.M., KELLY, D.F., CARTER, S.D., GASKELL C.J., (1991): Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. *Res. Vet. Sci.*, **51**: 11-18.
- TERADA Y, MATSUI N, NOGUCHI K, KUWATA R, SHIMODA H, ET AL. (2014) Emergence of Pathogenic Coronaviruses in Cats by Homologous Recombination between Feline and Canine Coronaviruses. *PLoS ONE* **9**(9): e106534. doi:10.1371/journal.pone.0106534.
- TERADA Y, SHIOZAKI Y, SHIMODA H, MAHMOUD HY, NOGUCHI K, ET AL. (2012) Feline infectious peritonitis virus with a large deletion in the 5' terminal region of spike gene retains its virulence for cats. *J Gen Virol*, **93**: 1930-1934.
- THIEL, V. (2007). Coronaviruses: molecular and cellular biology. *Caister Academic Press*, Norfolk, UK.
- THIEL, V., HAIJEMA, B.J., ROTTIER, P.J., DE GROOT, R.J., (2007). Feline Coronaviruses: A Tale of Two-Faced Types. In *Coronaviruses. Molecular and Cellular Biology*. Caister Academic Press: *Norfolk*, 183–203.
- TRESNAN, D.B., LEVİS, R., HOLMES, K.V. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J. Virol.* **70**, 8669–8674.

- VAN HAMME, E., DESMARETS, L., DEWERCHIN, H.L., NAUWYNCK, H.J. (2011). Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. *Virus Res.* **160**: 32-39.
- VIJAYKRISHNA., SMITH G. J. D., J. X. ZHANG, J. S. M. PEIRIS, H. CHEN, AND Y. GUAN (2007). Evolutionary Insights into the Ecology of Coronaviruses.
- WANG, Y., MA, G., LU, C., WEN, H. (2006). Detection of canine coronaviruses genotype I and II in raised Canidae animals in China. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, **119**: 35–39.
- WENTWORTH, D., HOLMES, K.V. (2001). Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): Influence of N-linked glycosylation. *J. Virol.*, **75**: 9741-9752.
- WESLEY, R. D. (1999). The S gene of canine coronavirus, strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus, *Virus Research* **61**(2): 145-152.
- WICHT, O., BURKARD, C., DE HAAN, C.A., VAN KUPPEVELD, F.J., ROTTIER, P.J., BOSCH, B.J. (2014). Identification and Characterization of a Proteolytically Primed Form of the Murine Coronavirus Spike Proteins after Fusion with the Target Cell. *J. Virol.*, **88**: 4943-4952.
- WOO, P. C. Y., HUANG, Y., LAU, S. K. P. & YUEN, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, **2**(8), 1804-1820.
- WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., HUANG, Y., YUEN, K.-Y. (2009). Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. *Experimental Biology and Medicine*, **234**: 1117-1127.
- YACHI, A., MOCHIZUKI, M. (2006). Survey of dogs in japan for group 2 canine coronavirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(7), 2615-2618.
- YEŞİLBAĞ, K., YILMAZ, Z., TORUN, S. AND PRATELLI, A., (2004). Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, **51**: 353–355.
- YEŞİLBAĞ, Z., YILMAZ, A., ÖZKUL, A., PRATELLI, A.(2007). Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *Veterinary Record*, **161**:169-170.
- ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; CAVICCHIOLI, L.; TINELLI, A.; CASTAGNARO, M. (2008). Systemic fatal type II coronavirus infection in a dog: Pathological findings and immunohistochemistry. *Res. Vet. Sci.* **84**: 278-282.
- ZICOLA, A., JOLLY, S., MATHIJS, E., ZIANT, D., DECARO, N., MARI, V., THIRY, E. (2012). Fatal outbreaks in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. *J. Small Anim. Pract.*, **53**: 297-300.

EKLER

EK 1 Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunca verilmiş izin belgesi



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :09/ 05/ 2012
TOPLANTI NO :2012-10
DOSYA NO :2012-52
KARAR NO :2012-10-75

Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.T.Çiğdem Oğuzoğlu'nun araştırma yürütücüsü olduğu, Doç.Dr.T.Çiğdem Oğuzoğlu ile Araş.Gör.Ayşegül Kudu'nun ortak çalışmaları olan "Evcil köpeklerde Canine Corona Virus (CCoV)'ların moleküler epidemiyolojisi." başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

- ☒ Uygun bulunarak onaylanmasına,
☐ Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YILGİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

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

sıra no	cinsiyet	yaş (ay)	aşı durumu	semptom	indoor/out	tekli/çoklu	M	UCD1 F-R	S5-S6
1	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
2	E	1	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
3	D	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
4	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
5	D	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
6	D	1	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
7	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
8	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	P	P	N
9	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
10	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
11	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
12	E	1	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
13	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
14	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
15	D	1	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
16	D	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
17	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
18	E	3	aşılı	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
19	E	4	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
20	D	2	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N
21	D	4	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
22	E	4	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
23	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
24	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
25	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
26	E	4	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
27	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
28	E	3	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
29	E	4	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
30	D	4	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
31	D	2	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N
32	E	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
33	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
34	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N

35	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N
36	D	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
37	E	4	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
38	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
39	E	4	aşılı	semptomlu	indoor	tekli	P	N	N
40	E	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	P	P	N
41	E	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
42	D	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	P	P	N
43	E	3	aşılı	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
44	E	4	aşılı	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
45	E	5	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
46	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
47	E	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
48	E	5	aşılı	semptomsuz	outdoor	tekli	N	N	N
49	E	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	N	N	N
50	D	2	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N
51	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	tekli	P	N	N
52	E	3	aşılı	semptomsuz	outdoor	tekli	P	N	N
53	D	2	aşılı	semptomsuz	outdoor	tekli	P	N	N
54	D	2	aşısız	semptomsuz	indoor	tekli	N	N	N
55	D	5	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
56	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
57	E	3	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
58	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
59	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
60	D	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
61	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
62	D	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
63	E	1	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
64	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
65	D	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
66	D	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
67	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
68	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	P
69	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
70	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
71	D	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
72	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
73	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
74	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
75	E	3	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	P	N	N
76	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N

77	E	1	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
78	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
79	D	4	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
80	D	2	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	P	N	N
81	E	3	aşılı	semptomsuz	indoor	tekli	N	N	N
82	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	tekli	P	N	N
83	E	3	aşılı	semptomsuz	outdoor	çoklu	P	N	N
84	D	2	aşısız	semptomlu	indoor	tekli	P	N	P
85	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
86	E	3	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	P
87	D	1	aşısız	semptomsuz	indoor	tekli	N	N	N
88	D	2	aşılı	semptomsuz	indoor	tekli	N	N	N
89	E	2	aşılı	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
90	E	3	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	N	N	N
91	E	2	aşılı	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
92	E	3	aşılı	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
93	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	tekli	N	N	N
94	E	6	aşılı	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N
95	D	4	aşılı	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
96	E	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	çoklu	P	P	N
97	D	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	P	N
98	D	2	aşısız	semptomsuz	outdoor	tekli	P	N	N
99	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	P	N	N
100	E	2	aşısız	semptomlu	outdoor	çoklu	N	N	N

EK-3 Dizin analizi yapılan örneklerin nükleotid verileri

>CCoV/Tr/2013/Ankara/83aS

GGGCTAGTAGACAACCTTGCTAAAGACAAAGTTAATGAATGCGTTAGGTCTCAATCCC
AAAGATTTGGATTCTGTGGTAATGGTACACATTTGTTTTCACTTGCAAATGCAGCACC
AAATGGCATGATTTTCTTTACACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAACTGTGACG
GCCTGGTCAGGTATTTGTGCTTCAGATGGCGAGCGCACTTTTGACTTGTTGTTAAA
GATGTCCAGCTGACGCTATTTTCGAATTTAGATGACAAATTCTATTTGACTCCCAGAA
CTATGTATCAGCCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGATTTTGTTCAAATTGAAGGGTGCGA
TGTCTTGTGTGCAATGCAACTGTAATTGAGTTGCCTAGTATTATACCTGATTATATCG
ATATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTACAGACCAAATTGGACAGTACC
TGAATTAACACTTGACATTTTCAACGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTGAAATTAAT
GACTTAGAATTCAGGTCAGAAAAGCTACATAACACTACGGTAGAATTGCTGTTCTC
ATTGACAATATTAACAATACATTAGTCAA

>CCoV/Tr/2013/Ankara/99aS

AATCCCAAAGATTTGGATTCTGTGGTAATGGTACACATTTGTTTTCACTTGCAAATGC
AGCACCAAATGGCATGATTTTCTTTACACAGTGCTATTACCAACAGCTTATGAACT
GTGACGGCCTGGTCAGGTATTTGTGCATCAGATGGCGATCGCACTTTTCGGACTTGTT
GTTAAAGATGTCCAGCTGACGCTGTTTCGAATTTAGATGACAAATTCTATTTGACTC
CTAGAATATGTATCAGCCCAGAGTTGCAACTAGTTCTGACTTTGTTCAAATAGAAGG
TTGTGATGTGTTGTTTGTAAATGCAACTGTAATTGAATTGCCTAGTATCATACCTGAC
TATATCGATATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTATAGACCAAATTGGAC
AGTACCTGAATTAACACTTGACATTTTCAACGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTGAA
ATTAATGACTTAGAATTCAGGTCAGAAAAGCTACATAACACCACGGTAGAATTGCT
GTTCTCATTGACAATATTAACAATACATTAGTCAATCTTGAATGGCTCAATAGAATTGA
AACTTATGT

>CCoV/Tr/2013/Ankara/101aS

GCTAGTAGACAACCTTGCTAAAGACAAAGTTAATGAATGCGTTAGGTCTCAATCCCAA
AGATTTGGATTCTGTGGTAATGGTACACATTTGTTTTCACTTGCAAATGCAGCACCAA
ATGGCATGGTCTTCTTTACACAGTGCTATTACCAACAGCTTACGAACTGTGACGG
CCTGGTCAGGTATTTGTGCTTCAGATGGCGATCGCACTTTTGACTCGTTGTTAAAG
ATGTCCAGTTGACGCTATTTTCGAATTTAGATGATAAATTCTATTTGACTCCCAGAAC
TATGTATCAGCCTAGAGTTGCAACTAGTTCTGACTTTGTTCAAATTGAAGGGTGCGAT
GTCTTGTGTGCAATGCAACTGTAATTGAGTTGCCTAGCATTATACCTGATTATATTG
ATATTAATCAGACTGTTCAAGACATATTAGAAAATTATAGACCAAATTGGACAGTACC
TGAATTAACACTTGACATTTTCAACGCAACCTACTTAAACCTGACTGGTGAAATTAAT
GACTTAGAATTCAGGTCAGAAAAGCTACATAACACCACGGTAGAATTGCTGTTCTC
ATTGACAATATTAACAATACATTGGTCAATCTTGAATGGCTCAAATCGAATTGAAAC
TTATGTAAATGGGGCCTTGGG

>CCoV/Tr/2013/Ankara/8bS

TCGTCTATCTTCAGTTACAATGGTACGTATATGATAACTCCTCGTAATATGTTTCAGC
CAAGAAAACCTCAGATGAGCGATTTTCGTGCAAATTACGAGTTGTGAAGTGACATTTT
AAACACTACATATACTACCTTTGAAGAGATTGTGATTGATTATATTGACATTAACAAGA
CTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCCAAATTTACAATTCCAGATTTTACTGAA
GGTCTCGAAATCTTCAATCAGACAAAATTAACCTCACTGCAGAAATTGATGAGCTAC

AAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTATTGCACATAATTTACAGGAGTACATCGACAA
TTTGAATAAGACACTTGTTGACCTTGAATGACTCAACA

>CCoV/Tr/2013/Ankara/10bS

CGTATGCATATGTATTGAAAGATTTCAAATCGTCTATCTTCAGTTACAATGATCACTGT
ATATGATAACTCCTCGTAATATGTTTCAGCCAAGAAAACCTCAGATGAGCGATTTTCGT
GCAAATTACGAGTTGTGAAGTGACATTTTTAAACACTACATATACTACCTTTGAAGAG
ATTGTGATTGATTATATTGACATTAACAAGACTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAG
TCCAAATTTCACAATTCCAGATTTTACTGAAGGTCTTGAAATCTTCAATCAGACAAAAT
TAAACCTCACTGCAGAAATTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTAT
TGCACATAATTTACAAGAGTACATCGATAATTTGAACAAAACACTT

>CCoV/Tr/2013/Ankara/13bS

ATGTATTGAATAGATTTCAAATCGTCCTCATCTTCAGTTACAATGGATACGTATATGAT
AACTCCTCGTAATATGTTTCAGCCAAGAAAACCTCAGATGAGCGATTTTCGTGCAAATT
ACGAGTTGTGAAGTGACATTTTTAAACACTACATATACTACCTTTGAAGAGATTGTGA
TTGATTATATTGACATTAACAAGACTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCCAAAT
TTCACAATTCCAGATTTTACTGAAGGTCTCTGAAATCTTCAATCAGACAAAATTAAC
CTCACTGCAGAAATTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTATTGCAC
ATAATTTACAGAGGAGTACATCGAATCAATTTGAACTAAAGAACACT

>CCoV/Tr/2013/Ankara/17bS

TCGTCTATCTTCAGTTACAATGGTACGTATATGATAACTCCTCGTAATATGTTTCAGC
CAAGAAAACCTCAGATGAGCGATTTTCGTGCAAATTACGAGTTGTGAAGTGACATTTTT
AAACACTACATATACTACCTTTGAAGAGATTGTGATTGATTATATTGACATTAACAAGA
CTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCCAAATTTCACAATTCCAGATTTTACTGAA
GGTCTCGAAATCTTCAATCAGACAAAATTAACCTCACTGCAGAAATTGATGAGCTAC
AAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTATTGCACATAATTTACAGGAGTACATCGACAA
TTTGAATAAGACACTTGTTGACCTTGAATGACTCAACA

>CCoV/Tr/2013/Ankara/40bS

GTATGCATACGTGTTGAAGATTTCAATTATCTATCTTCAGTTACAATGGTACGTATAT
GCTAACCCCTCGTAATATGTTTCAACCAAGAAAACCTCAGATGAGTGATTTTCGTGCA
AATTACGAGTTGCGAAGTGACATTTTTAAACACTACATATACTACCTTTGAAGAAATT
GTGATTGATTATATTGATATTAATAAGACTATCTCTGATATGCTTGAACAATATAGTCC
AAATTTCACAATTCCAGATTTTACTGAGGGTCTTGAAATCTTCAACCAGACAAAATTA
AACCTCACTGCGGAAATTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGACAATCTTACTGTTATT
GCACATAATTTACAGGAGTACATCGATAACCTAAATAAGACTCTTGTTGACCTTGAAT
GGCTCAACAGAATCGAACTTATGTAAATGGCC

>CCoV/Tr/2013/Ankara/100bS

TTGTGTTAATGACACGTATGCATATGTATTGAAAGATTTCAAATCATCTATCTTCAGTT
ATAATGGTACGTATATGATAACGCCTCGTAATATGTTTCAACCAAGAAAACCTCAGAT
GAGTGATTTCATACAAATTACGAGTTGTGAAGTGACATTTCTGAACACTACATATACT
ACCTTTGAAGAAATTGTGATTGATTATATTGATATTAACAAGACTATCTCTGATATGCT
TGAACAATATAGTCCAAATTTCACAATCCCAGATTTTACTGAGGGTCTTGAAATCTTC
AATCAGACAAAATTAACCTCACTGCAGAAATTGATGAGCTACAAGTTAGAGCAGAC

AATCTTACTATTATTGCACATAATTTACAAGAGTACATCGACAATTTGAACAAAACACT
TGTTGACCTTGAATGGCTCAACAGAATCGCAA

> CCoV/Tr/2013/Ankara/8cM

ATTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAG
AGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGT
GCATTAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTA
ACATTGCTCTCAGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAAATTGCAGGTGGTATGAAC
ATCGACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTAC
ACACTTGTTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGGCT

> CCoV/Tr/2013/Ankara/10cM

ATTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAG
AGGACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGT
GCATTAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTA
ACATTGCTCTCAGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAAATTGCAGGTGGTATGAAC
ATCGACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTAC
ACACTTGTTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGGCT

> CCoV/Tr/2013/Ankara/13cM

ATTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAG
GACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCA
TTAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCGACTGGTGTCACTTTAACA
TTGCTCTCAGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAAATTGCAGGTGGTATGAACATC
GACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGTAGGACCATTGTCTACACA
CTTGTTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGG

> CCoV/Tr/2013/Ankara/17cM

TTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAAGACTAAGTC
TTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCAATTAGGAAG
GAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTC
AGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAAATTGCAGGTGGTATGAACATCGACAATTT
GCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTACACACTTGTTGG
TAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATG

> CCoV/Tr/2013/Ankara/40cM

TTCCAGATATGTAATGTTTCGGTTTTAGTATCGCAGGTGCAGTTATTACATTTCGCACTT
TGGATTATGTATTTTGTGATCCATTCAGCTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGT
CTTTCAATCCTGAACTAATGCAATTCTCTGTGTTAGTGCACTTGGAAGAAGCTATGT
GCTTCCTCTCGAAGGTACACCAACTGGTGTTACGCTTACTTTGTTGTCAGGAAATCTT
TATGCTGAAGGATTCAAAATGGCTGGTGGGATGAACATCGAGCATTACCAAAATAC
GTAATGGTCGCATTACCTAGTAGAACTATTGTCTACACACTTGTTGGAAAGCAATTGA
AAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGCTACTAGT

> CCoV/Tr/2013/Ankara/83cM

TTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTCAGTTATACAGAAGG
ACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCCGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCA
TAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCGACTGGCGTCACTTTAACAT

TGCTCTCAGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAATTGCAGGTGGTATGAACATCG
ACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGTAGGACCATTGTCTACACACT
TGTTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGGCTTACTA

> CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-nasal

TTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGTTATACAGAAGGACTAAGTC
TTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCATTAGGAAG
GAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTC
AGGGAATTTGTACGCTGAAGGGTTCAAATTGCAGGTGGTATGAACATCGACAATTT
GCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTACACACTTGTTGG
TAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAA

> CCoV/Tr/2013/Ankara/99cM-rektal

TTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGTTATACAGAAGGACTAAGTC
TTGGTGGTCTTTCAACCCTGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCATTAGGAAG
GAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCAACTGGTGTCACTTTAACATTGCTCTC
AGGGAATTTGTACGCTGAAGGGTTCAAATTGCAGGTGGTATGAACATCGACAATTT
GCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGCAGGACCATTGTCTACACACTTGTTGG
TAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAA

> CCoV/Tr/2013/Ankara/100cM

TTCCAGATATGTAATGTTTCGGTTTTAGTATCGCAGGTGCAGTTATTACATTTCGCACTT
TGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGCTATACAGAAGGACTAAGTCTTGGTGGT
CTTTCAATCCTGAACTAATGCAATTCTCTGTGTTAGTGCATTGGAAGAAGCTATGT
GCTTCCTCTCGAAGGTACACCAACTGGTGTACGCTTACTTTGTTGTCAGGAAATCTT
TATGCTGAAGGATTCAAATGGCTGGTGGGATGAACATCGAGCATTACCAAAATAC
GTAATGGTCGCATTACCTAGTAGAACTATTGTCTACACACTTGTTGGAAAGCAATTGA
AAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGCTACTAGT

> CCoV/Tr/2013/Ankara/101cM

TTGTTACATTTATACTTTGGATTATGTATTTTGTAGATCCATTTCAGTTATACAGAAGG
ACTAAGTCTTGGTGGTCTTTCAACCCCGAACTAACGCAATTCTTTGCGTTAGTGCAT
TAGGAAGGAGCTATGTGCTTCCTCTTGAAGGTGTGCCGACTGGCGTCACTTTAACAT
TGCTCTCAGGGAACCTGTACGCTGAAGGGTTCAAATTGCAGGTGGTATGAACATCG
ACAATTTGCCAAAGTACGTAATGGTTGCATTACCTAGTAGGACCATTGTCTACACACT
TGTTGGTAAGAAATTGAAAGCAAGTAGTGCAACAGGATGGGCTTACTA

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler:

Adı : Ayşegül

Soyadı : KUDU

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun, 18/02/1985

Uyruğu : T.C

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi : 1296. Cad. 6/16 Balgat/ ANKARA

E-posta : kuduaysegul@gmail.com

GSM : +90 539 215 3577

II. Eğitimi

Lisans : Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara

Yabancı Diller : İngilizce

III. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Derneği

IV. Bilimsel İlgi Alanları

Köpek hastalıkları, *Coronaviridae*, Sığır hastalıkları, ŞAP Hastalığı, *Picornaviridae*, *Flaviviridae*.

Yayınları

Oğuzoğlu, T. Ç., Timurkan, M. Ö., Muz, D., Kudu, A., Numanbayraktaroğlu, B., Sadak, S., Burgu, I. (2010). First molecular characterization of feline immunodeficiency virus in Turkey. Archives of virology, 155(11), 1877-1881.

Bildirileri

Kudu A., Timurkan M.Ö., Özen D., Oğuzoğlu T.Ç. (2010). Ankara'daki Evcil Kedilerde FPV ve FIPV Enfeksiyonlarının Araştırılması, 9. Mikrobiyoloji Kongresi, Kuzey Kıbrıs, 5-7 Ekim 2010.

İş Deneyimleri

1. 2009-2014: A. Ü. Vet. Fak. Viroloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi.
2. 2014-Halen: Şap Enstitüsü, Veteriner Hekim.

Aktiviteler

VII. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2006, Antalya.

Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kursu (Kursiyer), ANKÜSEM, 31 Mayıs 2010-8 Haziran 2010.

Hantavirus Sempozyumu, 29 Mart 2010.

IX. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs, 5-7 Ekim 2010.

Moleküler Biyoloji Yöntemleri, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 25-29 Nisan 2011.

IX. International Congress of Veterinary Virology, Madrid, İspanya, 4-7 Eylül 2012.

From Gene to Protein Seminar, Ankara, 18 Mart 2014.

Verdiği Seminerler

- 1- Baltimore Sınıflandırmasına Temel Teşkil Eden Virus Replikasyon Mekanizmaları.
- 2- Pestivirus Enfeksiyonlarında Moleküler Evrim.