



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



RUMİNANT PARAPOX VİRUS ARŞİV
MATERYALLERİNDE ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L),
ORFV020 (VIR), ORFV127 (VIL-10) GENLERİNİN
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Emre DURMUŞ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RUMİNANT PARAPOX VİRUS ARŞİV
MATERYALLERİNDE ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L),
ORFV020 (VIR), ORFV127 (VIL-10) GENLERİNİN
MOLEKÜLER TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI

Emre DURMUŞ

VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

ANKARA

2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ruminant Parapox Virus Arşiv Materyallerinde ORFV011(B2L), ORFV059 (F1L), ORFV020 (VIR), ORFV127 (vIL-10) Genlerinin Moleküler Tekniklerle Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Emre DURMUŞ

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Viroloji Anabilim Dalında

Emre DURMUŞ tarafından hazırlanan ‘‘Ruminant Parapox Virus Arşiv Materyallerinde ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L), ORFV020 (VIR), ORFV127 (vIL-10) Genlerinin Moleküler Tekniklerle Araştırılması’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul / red edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1.GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	1
1.2.Amaç ve Kapsam	3
1.3.Etiyoloji	6
1.4.Sınıflandırma	11
1.5.Epidemiyoloji	16
1.6.Virus Replikasyon Mekanizması ve Patogenez	19
1.6.1.Virusun dokuya girişi	19
1.6.2.Virus replikasyon siklusu	21
1.7.ORFV Enfeksiyonuna Karşı Oluşan İmmun Yanıt Mekanizması	22
1.7.1.ORFV enfeksiyonlarının neden olduğu immün yanıtlar	22
1.7.2.ORFV enfeksiyonuna karşı doğuştan ve adaptif immün yanıt	23
1.8.Klinik Bulgular	25
1.9.Tanı	27
1.9.1.Virus izolasyonu	27
1.9.2.Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile nükleik asit tespiti	27
1.9.3. Elektron mikroskopi	28
2.GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1.Gereç	31
2.1.1. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Örnekler	31
2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	32
2.1.3.Primerler	33
2.1.4.Cihazlar	33
2.2.Yöntem	35
2.2.1.Viral Nükleik Asit İzolasyonu	35
2.2.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
2.2.3.PCR Ürünlerinin Agaroza Jel Elektroforezi	36
2.2.4.Jel Ekstraksiyon Protokolü	37
2.2.5.Clean-up Protokolü	38
2.2.6.Dizin Analizi	38
2.2.7. Moleküler <i>in silico</i> analiz, Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması	40

3.BULGULAR	41
3.1.Virolojik Kontrol Sonuçları	41
3.1.1.Viral Nükleik Asit İzolasyon Sonuçları	41
3.1.2.Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları	44
4.TARTIŞMA	57
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	66
ÖZET	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
EKLER	83
ÖZGEÇMİŞ	85



ÖNSÖZ

Parapoxviruslar dünya çapında yaygın, insan ve hayvan sağlığını etkileyen zoonoz tabiatlı, önemli ve bulaşıcı epitelyotropik viruslardır. Konakçı aralığı olarak ruminant türlerinin ağırlıklı olduğu bu viruslar, yaralı ya da hasar görmüş deri yoluyla bulaşarak, deride ve bazen de bukkal mukozada püstüler lezyonlara yol açar. Düşük mortalite ve yüksek morbiditeye sahip bu hastalığın yayılmasında aft kabukları etkilidir. Dünyanın hemen her coğrafyasında görülen bu viruslar ülkemizde de yaygın olarak bulunmaktadır.

Parapoxvirusların hayvanlarda ve insanlarda meydana getirdiği enfeksiyonların önlenmesi için en etkili ve ekonomik yöntem aşılamadır. Enfeksiyonlarla mücadelede sahada sirküle olan virusların moleküler karakterizasyonunun yapılması ve bölgeden bölgeye ve türden türe farklılık göstermesi olasılığıyla mücadelede seçilecek aşının da belirlenmesine katkı sağlayacağı noktasından hareketle, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Viroloji programı bünyesinde yürütülen bu yüksek lisans tezi planlanmış olup, 01.01.2022- 21.12.2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, yalnızca tez çalışmamda değil her konuda yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof.Dr. Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU'na, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a, Viroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Feray ALKAN, Prof. Dr. Seval BİLGE-DAĞALP, Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU, Doç. Dr. Ayşe Zeynep AKKUTAY-YOLDAR hocalarıma yüksek lisans eğitimim boyunca yardım ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Eda ERDEM ŞAHİNKESEN ve Viroloji Anabilim Dalının tüm araştırma görevlisi ile lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma ve idari personeline teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
BLAST	Basic Local Allignment
BPSV	Bovine Papular Stomatitis Virus
cDNA	Komplementer Deoksiribo-Nükleik Asit
CO ₂	Karbondioksit
dNTP	Deoksiribo-Nükleik-Asit
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EEV	Envelope Phospholipase
ICTV	Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IMP	İmmunomodülatör Protein
mL	Mililitre
mg	Miligram
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORFV	Orfivirus
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PCPV	Pseudocowpox Virus
PPV	Parapoxvirus
PV	Poxvirus
WOAH/OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>Chitovirales</i> Taksonomik Düzeni	6
Şekil 1.2. ORFV genomik DNA yapısının şematik gösterimi	8
Şekil 1.3. Virusların tam proteom ağacı.	14
Şekil 1.4. Poxvirusların 47 proteine dayalı filogenetik ağaç analizi.	15
Şekil 1.5. Parapox virusu yaşam döngüsü	21
Şekil 1.6. Deri lezyonundan kazımalarda parapoxvirus parçacıklarının elektron mikrografları	29
Şekil 2.1. Reaksiyon Koşulları	36
Şekil 3.1. B2L gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 3.2. F1L gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 3.3. VIR gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 3.4. VIL gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü	43
Şekil 3.5. B2L geni yönünden filogenetik ağaç	45
Şekil 3.6. F1L geni yönünden filogenetik ağaç	47
Şekil 3.7. VIL geni yönünden filogenetik ağaç	49
Şekil 3.8. VIR geni yönünden filogenetik ağaç	51
Şekil 3.9. B2L gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu	53
Şekil 3.10. F1L gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu	54
Şekil 3.11. VIL gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu	55
Şekil 3.12. VIR gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu	56

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Poxviridae ailesine ait genusların sınıflandırılması	13
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan arşiv materyali ve 1 adet referenz suşa ait bilgiler.	30
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler	32
Çizelge 2.3. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı ve Isı Döngüsü	37
Çizelge 3.1. Saha örnekleri ve virus izolatlarına ait viral nükleik asit miktarı (ng/uL)	39
Çizelge 3.2. Örneklerle ait amplikon pozitiflikleri, baz uzunlukları ve GenBank Accession numaraları	44
Çizelge 3.3. B2L gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri	46
Çizelge 3.4. F1L gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri	48
Çizelge 3.5. VIR gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri	50
Çizelge 3.6. VIL gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri	52

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Poxviridae ailesi, enfeksiyon tarihçesi milattan öncelere (MÖ) dayanan, hem insan hem de hayvanları enfekte edebilen viral etkenleri barındırır. *Chordopoxvirinae* alt ailesinin içerisinde yer alan, Orthopoxviruslar (Çiçek hastalığı (variola), maymun çiçeği, vaccinia, sığır çiçeği, vd.) ve Parapoxviruslar (ORF virusu, sığır papüler stomatit virusu, pseudocowpox virusu, deerpox virusu, vd.) 18 genus içerisinde en tanınanlar olarak sayılmaktadır.

Çiçek hastalığı ve molluscum contagiosum sadece insanlara özgü iken, özellikle Parapoxvirus (PPV) genusundaki etkenler zoonotik enfeksiyonlara neden olur. Orthopoxvirus genusundaki Smallpoxvirus enfeksiyonunun aşılama sayesinde eradikasyonu 1980'li yılların başında gerçekleşmiş olmakla birlikte, PPV genusuna ait etkenlere özgü “Tek Sağlık” konsepti açısından da önemli viral enfeksiyonlar hala güncelliğini korumaktadır.

Poxvirus enfeksiyonlarının tarihçesi antik çağlara kadar uzanmaktadır. Çiçek hastalığının ilk kanıtı, 18. Hanedanlığın (MÖ 1580-1350) Mısır mumyalarında bulunmuştur. Variola, MÖ 1. binyılda Hindistan'da endemik hale gelmiş ve sekizinci yüzyılda Asya'ya ve nihayetinde Avrupa'ya yayılmıştır. Çiçek hastalığının 15. ve 16. yüzyıllarda Yeni Dünya'ya tanıtılması, Kızılderili nüfusunu büyük ölçüde azaltmıştır. İngilizler, Fransız-Hint savaşları sırasında çiçek hastalığını biyolojik silah olarak kullanmışlardır. Çiçek hastalığı, 20. yüzyıla kadar dünya çapında önemli bir sorun olmaya devam etmiş ve Avrupa'da her yıl yarım milyon ölüme neden olmuştur. 20. yüzyılda yoğun bir aşılama programıyla çiçek hastalığı eradike edilerek, ortadan kaldırılmıştır (Shanley, 2015).

PPV'ların geçmişi Robinson ve Lyttle (1992) tarafından gözden geçirilmiş, obanlar tarafından koyunlardaki uyuz hastalığı uzun süredir bilinmesine rağmen, bulaşıcı püstüler dermatit veya ORFV, ilk kez 1787 yılında tanımlandığı rapor edilmiştir (Steeb, 1787). ORFV'nin bulaşıcı bir doğasının olduğu fark edilmiş (Walley, 1890) ve ORFV'nin oluşturduğu enfeksiyonların insanları da etkilediği uzun zamandan beri bilinmektedir (Hansen, 1879).

1923 yılına gelindiğinde, enfeksiyonun birçok bakteriden daha küçük olan ve "filtrelenebilir" viruslar grubuna dahil edilebilmesi mümkün bir ajan tarafından koyunlar arasında bulaşabileceği bildirilmiştir (Aynaud, 1923). Aynaud (1923), ayrıca ORFV'nun çapraz koruma yapmaması nedeniyle Vaccinia virusundan (VACV) ayırt edilebileceğini göstermiş ve doğal hastalığı, virusun histolojik görünümlünü, bağışıklığın gelişimini ve süresini, virusun solventlere ve kimyasallara duyarlılığını, pasif serum transferinin sağladığı koruma eksikliğini ve zayıflatılmamış canlı ORFV olan bir aşının geliştirildiğini tanımlamıştır.

Günümüzde ORFV'a karşı hücre kültüründe üretimle zayıflatılmış canlı virus aşıları kullanılmaktadır. Bugün Pseudocowpox olarak bilinen hastalık ise, 1930'lardan önce uzun bir süre sığırılarda mevcut olmasına rağmen, sığır çiçeğinden kolayca ayırt edilememiştir. Eski kaynakların gözden geçirilmesinde Bonnevie (1937), "vaccine rouge" olarak adlandırılan bazı iek hastalığı aşılarının, gerçek sığır çiçeği hastalığından farklı lezyon formları ürettiğini ve bu lezyonlardan gelen aşı materyalinin sığır çiçeği hastalığına karşı koruma sağlamadığını fark etmiştir. Bu tür enfeksiyonlar yalancı sığır çiçeği, paravaccine, sağımcı nodülleri olarak adlandırılmış ve iek hastalığına karşı koruma sağlamadığı rapor edilmiştir.

Lipschutz (1932), insanlardaki hastalığa paravaccinia adını vermiş ve diğerleri ile birlikte, enfeksiyöz materyalin tavşanların korneasına aşılanmasını içeren Pauls testinin uygulanmasıyla, sağımcı nodüllerinin ajanını sığır çiçeğine neden olan ajandan ayırt edebilmiştir. İnek çiçeğinden farklı olarak, sağımcı nodülleri herhangi

bir lezyon oluşturmamıştır. 1963'te virus, sığırlarda meme başı lezyonlarından ve sağmal nodüllerinden hücre kültürlerinde izole edilerek, virionların elektron mikroskobu ile ORFV ve BPSV'ye benzediği gösterilmiştir. BPSV'nin neden olduğu hastalığı tanımlayan ilk literatür Griesemer ve Cole (1960)'a ait olup, ilerleyen yıllarda Robinson ve Lyttle (1992) tarafından incelenmiştir.

ORFV enfeksiyonu ilk olarak Avrupa kıtasında Belçika'da 1884 yılında tanımlanmış olup “la stomatite papillaire ou papillomateuse” (papüler veya papillomatöz stomatit) olarak adlandırılmıştır (Degive, 1884). Sığır papüler stomatit enfeksiyonun kesin karakterizasyonu ise, virusun hücre kültüründen izolasyonu ve buzağılarda hastalığın üremesini gerçekleştiren Griesemer ve Cole (1961) ve Plowright ve Ferris (1959) tarafından yapılmıştır. Sığır papüler stomatitinin insanlara bulaştığına dair ilk rapor Carson ve Kerr (1967)'e aittir. Her ne kadar yeni karakterize edilmiş olsalar da PPV'lar var oldukları bilinen etkenler olup, 1960'ların sonlarından itibaren farklı hayvan türlerinde de (deve, fok, Ala geyik, Ren geyiği, vb.) PPV hastalıkları rapor edilmiştir (Fauquet ve ark, 2005; Horner ve ark., 1987 ve Robinson ve Mercer, 1995).

1.2. Amaç ve Kapsam

Bulaşıcı ektima, dünya çapında evcil koyun ve keçileri etkileyen bir Parapox virusudur (Peralta ve ark., 2018; Tedla ve ark., 2018; Wilson ve McFarlane, 2012 ve Yirrell ve ark., 1989). Enfeksiyon genellikle benign bir yapıya sahiptir. Epitel hücrelerinde üreyen virus, keratinize hücre proliferasyonu sonucunda tümör benzeri vaskülarize lezyonlara neden olabilir. Enfekte hayvanlarla doğrudan temas ve çevresel kontaminatlar yoluyla bulaşır (Tedla ve ark., 2018).

PPV'lar oldukça geniş bir coğrafi dağılıma sahiptir. Büyük bir alana yayılmış olmalarının en temel sebebi PPV'ların çevresel faktörlere karşı dayanıklı bir yapıya

sahip olmaları ve sık aralıklarla reenfeksiyonlara neden olmalarıdır. Bu özellikler, bu virusların bulaştığı popülasyonlarda çok uzun süreler kalmasına ve bu bulaşıcılıklarına devam etmelerine neden olmaktadır (Robinson ve Lyttle, 1992). Epidemiyolojik olarak bakıldığında PPV'ların en tanınan üç türü olan ORFV, PCPV ve BPSV geniş coğrafi dağılıma ve yayılıma uyarken; PPV cinsinin dördüncü türü olarak kabul edilen Yeni Zelanda Alageyikleri Parapoxvirusu'nun (PVNZ) epidemiyolojisi, başlangıçta anıldığı üzere Yeni Zelanda bölgesi ile sınırlı kalmıştır. Bu etken (PVNZ) diğer bilinen PPV türlerinden hem epidemiyolojik hem de genomik olarak da farklıdır (Oğuzoğlu ve ark, 2014).

Ülkemizde varlığı uzun yıllardan beri biliniyor olmasına karşın, PPV'ların ve özellikle ORFV'nun Türkiye'deki sığırlarda neden olduğu deri enfeksiyonuna dair bir kayıt, oldukça yakın zamana aittir (Şevik, 2019). Ayrıca sığırlarda PPV üyesi olan diğer iki (PCPV ve BPSV) enfeksiyonun varlığı da bildirilmiştir (Oğuzoğlu ve ark, 2014 ve Timurkan ve ark, 2021). Ülkemizde PPV'lar endemik olarak bulunduklarından hayvan hareketleri sebebiyle periyodik olarak salgınlara neden olabilen enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bununla birlikte, bu tez konusuna orijinalite kazandıran ORFV suşları arasında benzerlik ya da farklılıkların ortaya koyulduğu retrospektif bir çalışmaya literatür bilgide rastlanmamıştır.

Deride oluşan lezyonlar nedeni ile sığır, keçi ve koyun dericilik endüstrisinde ekonomik kayıplara ve immunsupresyona neden olabildiğinden Poxvirus enfeksiyonları önemlidir. Türkiye'de sığırlarda Capripoxvirus genusundan noduler ekzantem virusu (LSDV), Parapoxvirus genusundan BPSV ve PCPV'nin neden olduğu viral deri hastalıkları bildirilmiştir (Oğuzoğlu ve ark, 2014; Şenturk ve ark, 2016 ve Şevik ve Doğan, 2017). Şevik (2019) çalışmasında, Türkiye'nin Ege, İç Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde bulunan farklı illerdeki sığırlarda ORFV enfeksiyonu salgınlarını tanımlamıştır.

Bu tez çalışmasının amaç ve kapsamı aşağıda özetlenmiştir:

- PPV enfeksiyonu yönünden 2003 ila 2021 yılları arasında pozitiflik saptanan arşiv materyallerinde (n=9) yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları ile viral genomun 4 farklı bölgesine spesifik dizinlerin kazanılması hedeflenmiştir.
- İlgili gen bölgeleri yönünden pozitif bulunan ampikonların sekans analizi ile elde edilen dizinlerinin, NCBI-GenBank veri tabanında bulunan dizinlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.
- Ülkemize ait PPV'ların dünyadaki hem cinsleri ile benzerlik ve farklılıklarının ortaya koyulabilmesi için, gen bölgelerine spesifik dizinlerin filogenetik analize tabii tutulması ve araştırılan dört gen bölgesine yönelik dizinlerin, GenBank'ta depolanması da diğer bir çalışma hedefini oluşturmaktadır.
- Sahada sirküle olan PPV suşlarına yönelik retrospektif bir bilgi kazanımı amaçlanmış olup, hastalığa neden olan virusların yıllar içerisindeki değişimleri ve mutasyonları hakkında fikir sahibi olunması hedeflenmiştir.
- Enfeksiyonlarla mücadelede sahada sirküle olan virusların moleküler karakterizasyonlarının yapılması önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasının nihai hedefi olarak; oluşabilecek mutasyonların yıldan yıla, coğrafyadan coğrafyaya ve türden türe farklılıkları olabileceği ihtimalinden hareketle, PPV enfeksiyonları ile mücadelede seçilecek yolun belirlenmesinde katkı sağlayacak sonuçların elde edilmesi amaçlanmıştır.

1.3. Etiyoloji

Poxviridae, hem insanları hem de hayvanları enfekte edebilen virusları içeren bir aile olup, oldukça büyük, çift sarmallı DNA virusları olarak klasifiye edilmişlerdir (Bloomquist, 2018).

Etiyolojik ajan olarak; elektron mikroskopta oval formda, “iplik yumağı” şeklinde ve 220–300 nm × 147–170 nm boyutlarındadır. Bu özellikleri ile diğer çiçek viruslarından ayrılırlar (Haig ve Mercer, 1998 ve Li ve ark., 2007) (Şekil 1.2). ORFV genomu, yaklaşık 138 kbp'lik büyüklükte, çift sarmallı, doğrusal bir DNA molekülüdür ve bünyesinde 132 civarında gen bulundurmaktadır (Delhon ve ark., 2004).

Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) tarafından yapılan güncel sınıflandırmada; *Poxviridae* ailesinin bir alt ailesi olan *Chordopoxvirinae*'de yer alan *Parapoxvirus* genusunda 5 tür bulunmaktadır (Şekil 1.1). Bunlar; Bovine papular stomatitis virus, Grey sealpox virus, Orf virus, Pseudocowpox virus, Red deerpox virus'tur (ICTV, 2020). Ayrıca sincaplarda tespit edilmiş ve sınıflandırılmamış bir Parapoxvirus (PPV) da bildirilmiştir (Thomas ve ark, 2003).

Family: <i>Poxviridae</i>	Order: <i>Chitovirales</i>	1 family, 2 subfamilies, 22 genera, 83 species	1
Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>	Family: <i>Poxviridae</i>		1
+ Genus: <i>Avipoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Capripoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Centapoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Cervidpoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Crocodylidpoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Leporipoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Macropopoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Molluscipoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Mustelpoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Orthopoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Oryzopoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
- Genus: <i>Parapoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
Species: <i>Bovine papular stomatitis virus</i>	Genus: <i>Parapoxvirus</i>		1
Species: <i>Grey sealpox virus</i>	Genus: <i>Parapoxvirus</i>		1
Species: <i>Orf virus</i>	Genus: <i>Parapoxvirus</i>		1
Species: <i>Pseudocowpox virus</i>	Genus: <i>Parapoxvirus</i>		1
Species: <i>Red deerpox virus</i>	Genus: <i>Parapoxvirus</i>		1
+ Genus: <i>Pteropoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Salmonpoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Sciuripoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Suipoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Vespertilionpoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1
+ Genus: <i>Yatapoxvirus</i>	Subfamily: <i>Chordopoxvirinae</i>		1

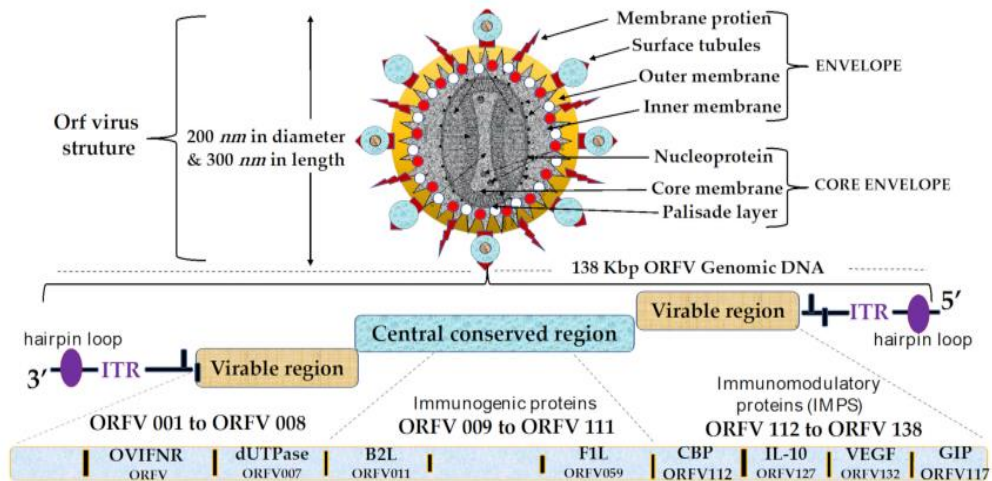
Şekil 1.1. *Chitovirales* Taksonomik Düzeni

(<https://ictv.global/taxonomy> Erişim Tarihi: 18 Aralık 2022).

Yüzeyde tubuler filamentöz bir yapı sergileyen viral kapsid proteinleri, elektron mikroskopik olarak iplik yumağı şeklinde tanımlanmasına sebep olur (Alcami ve ark, 1998). Kalın bir dış çeperle çevrili virion partikülünün iç zarı; nükleer membran, viral core bölgesinin dışını çevreleyen palisade tabakası ve nükleoproteinden oluşur (Lacasta ve ark, 2021 ve Yahaya ve ark, 2019), ORFV genomu; virusun patogenezi, virülansı, konakçı aralığı (Achen ve ark, 1998 ve Hani ve ark, 2010) ve immünomodülatör aktivitelerinden sorumlu olan ve birbirlerinden %17'lik oranda yüksek değişkenlik gösteren genlerden oluşur (Johnston ve Mcfadden, 2003, Heidarieh ve ark, 2015). Özellikle, ORFV enfeksiyonuna karşı konakçının doğuştan gelen ve preinflamatuvar yanıtlarını modüle eden birkaç immünomodülatör proteini (IMP'ler) kodlar (Delhon ve ark., 2004; Haig ve ark., 2002a; Haig ve ark., 2002b ve Weber ve ark., 2003). Bugüne kadar açıklanan IMP'ler arasında, bir kemokin bağlayıcı protein (CBP; ORFV112) (Seet ve ark., 2003), küçükbaş hayvan granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör ve interlekin-2'nin (GIF, ORFV117) çözünür protein

inhibitörü (Deane ve ark., 2000) ve koyun interlökin-10'unun (vIL-10; ORFV127) ortoloğunu kodlayan bir gen (Fleming ve ark., 1997), Yeni Zelanda'da (Mercer ve ark., 1987) bulunan ve kapsamlı olarak incelenen bir ORFV suşu olan ORFV NZ2 suşuna dayalı olarak karakterize edilmiştir. ORFV112'nin delesyonu, ORFV NZ2'nin zayıflamasıyla sonuçlanmıştır (Fleming ve ark., 2017). ORFV117'nin işlevi tanımlanmış (Deane ve ark., 2000) olmakla birlikte ORFV patogenezindeki rolü henüz araştırılmamıştır. Diğer yandan, vIL-10 ortoloğu olan ORFV127'nin delesyonunun kuzularda ORFV virulansını kısmen etkilediği gösterilmiştir (Fleming ve ark., 2007).

Benzer ancak komplementer nükleotid dizileri olan 3 kbp'lik ters çevrilmiş terminal tekrarlar (ITR'ler) ile çevrili değişken bölgeler, genomik DNA'nın (Heidarieh ve ark., 2015) 3' terminal uçlarında bulunur ve hair pin (saç tokası) olarak adlandırılan halkalarla güçlü bir şekilde bağlanır (Lateef ve ark., 2010, Mercer ve ark., 1987 ve Spyrou ve Valiakos, 2015). Diğer yandan, ORFV'nin merkezi korunmuş bir yapıda olan genomik bölgesi, viral replikasyon, transkripsiyon ve morfogenezden sorumlu olan tüm genomun yaklaşık %80'ini oluşturur (Anderson, 1997; Boughton ve ark., 1935; Lateef ve ark., 2010; Spyrou ve Valiakos, 2015 ve Yahaya ve ark., 2019).



Şekil 1.2. ORFV genomik DNA yapısının şematik gösterimi (Bukar ve ark., 2021)

Bu bölümde; tez çalışmasında incelenecek olan 4 viral gen bölgesine ait detaylı bilgiler sunulmuştur:

- ORFV011 (B2L) EEV Envelope phospholipase, EEV phospholipase, Envelope protein, Major envelope protein
- ORFV059 (F1L) Immunodominant envelope antijen
- ORFV020 (VIR) dsRNA-binding, interferon resistance- hücrel interferon aktivitesi inhibe eden gen bölgesi
- ORFV127 (vIL-10) Viral interleukin-10 homolog gen bölgesi

PPV'ların 2 adet immun dominant proteini vardır: Bunlar; ORFV011 ve ORFV059'dur. Özellikle B2L (ORFV011) ve F1L (ORFV059) korunaklı bölge içinde yer alan, başlıca immünojenik proteinlerdir. ORFV'ye karşı konak immun yanıtı karmaşık olmakla birlikte, ORFV'nin başlıca zarf proteinlerinin güçlü bir bağışıklık tepkisini indükleyebileceği gösterilmiştir (Czerny ve ark., 1997 ve Housawi ve ark., 1998). Büyük bir immünojenik protein olarak ORFV011 proteininin, lenf düğümlerinden üretilen lenfositleri uyarak güçlü bir antikor tepkisini indükleyebildiği bildirilmiştir (Sullivan ve ark., 1994). Bunun yanında, ORFV059 proteininin antijenik olarak özdeş olan ORF viral suşlarına karşı subunit aşılarında bir antijen olarak çalışma potansiyeli belirtilmiştir. Ayrıca, konakta nötralizan antikorların indüklenmesinden sorumludur ve viral yaşam döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır (Czerny ve ark., 1997 ve Scagliarini ve ark., 2002). ORFV 011 ve ORFV059 proteinlerinin immünojenitesi göz önüne alındığında, ORFV011 ve ORFV059 proteinlerinin kimerik ekspresyonunun daha güçlü immun yanıtları indüklemesi mümkündür. Saha izolatlarında PPV'ların zarf (envelope) genlerine ait nükleotid ve amino asit sekanslarının karşılaştırması; konakçı türünden, coğrafi kökeninden ve izolasyon tarihinden bağımsız olarak; bu genlerin genellikle oldukça korunmuş olduğunu göstermektedir (Guo ve ark., 2003; 2004; Inoshima ve ark., 2000, 2001; Klein ve Tryland, 2005 ve Tikkanen ve ark., 2004). Bu özellik envelope geninin PPV'lar için genetik belirteç olarak seçilmesine neden olmuştur. Bu nedenle tanıda tercih edilen gen bölgesidir ve filogenetik analizlerde viral zarf geninin dizinlerinin karşılaştırılması da önem arz eder.

Kısaca özetlemek gerekirse; ORFV enfeksiyonlarına karşı aşılama (profilaksi) veya enfeksiyon sonrası şekillenen antikor yanıt bu bölgeler tarafından indüklenmektedir (Wassie ve ark., 2019 ve Yogisharadhya ve ark., 2018). Bu tür korunmuş (ORFV 011 ve ORFV 059) antijenlerine karşı humoral ve T hücre yanıtlarının uyarılmasının, ORFV enfeksiyonlarına karşı güçlü koruma sağladığı bildirilmiştir (Gallina ve ark., 2020). İmmünojenik proteinler (ORFV 011 ve ORFV 059) tarafından ortaya çıkarılan yüksek düzeyde nötralize edici antikorların ve T hücre yanıtının varlığı, bu bölgelerin kullanıldığı kimerik rekombinant DNA ve subunit aşılarda geliştirilmesine yol açmıştır (Zhao ve ark., 2010).

ORFV011 ve ORFV059 dizileri genellikle ORF virusunun filogenetik analizi için kullanılır ve bu iki gene ait sekanslar epidemiyolojik olarak önemli diziler olarak kabul edilirken (Chi ve ark., 2015, Hautaniemi ve ark., 2010 ve Zhao ve ark., 2010), ORFV020 (VIR) gibi diğer genler de ORFV'nin moleküler epidemiyolojik çalışmalarında bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Chan ve ark., 2009 ve Oem ve ark., 2013). Genellikle filogenetik analiz, virus suşlarının varsayımsal kökenini gösterdiğinden; ORFV011 ve ORFV059'a dayalı olarak ORFV enfeksiyonunun orijin bilgisi belirlenebilmektedir.

ORFV20 geni, interferonların antiviral aktivitesini inhibe eden bir dsRNA bağlayıcı proteini kodlayan interferon direnç geni (VIR) olarak da bilinir (Haig ve Mercer, 1998 ve McInnes ve ark., 2001). İlgili genin sekanslarına dayalı olarak yapılan filogenetik ağaçlarda, PPV'leri gruplandırmak mümkün olabilmektedir. Bu bağlamda grup I'de, Hindistan, Çin; Grup II'de, Brezilya, ABD, İngiltere, Yunanistan, Arjantin, İtalya ve Japonya'dan izolatlar; Grup III'de, çoğunlukla Kore'den izolatlar olan bir çalışmada bu genogrupsu coğrafik farklılıkların tespitine de hizmet etmektedir. Ayrıca bu gen bölgesinin filogenetik analizi, bu bölgeye özel mutasyonların tespitine de imkân tanımaktadır. Bu mutasyonlar, ülkelerdeki morbidite oranları ile ilişkilendirilmektedir. Böylece ORF virusları arasındaki heterojenitenin belirlenmesine de olanak sağlanmış olmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonların analizi

ile suşların virulent veya non-virulent olarak sınıflandırılması da mümkün olabilmektedir (Sereewit ve ark, 2022).

Enfeksiyonun erken bir proteini olan ORFV127 geni, viral IL-10 proteini kodlar ve 21,7-kDa büyüklüktedir. Viral IL-10, 185 amino asitten oluşan ve IL-10'a olağanüstü homolojisi olan bir pleiotropik sitokindir. VIL-10'un virulens ve viral immün kaçışta rolü vardır. Lenfositlerden IFN- γ ve makrofajlar ve keratinositlerden TNF ve IL-8 sentezi gibi sitokinlerin sentezinin inhibe edilmesini sağlayarak; immunosupresyonda önemli bir rol oynar. Ayrıca dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve işlevselliğini de engeller. Murin modellerinde virusla enfekte deride monosit, dendritik hücreler ve mast hücrelerinin yerini aldığı gösterilmiştir. VIL-10 geninin bulunmayan bir ORFV, doğal konakçı olan koyunlarda attenüe özellik gösterdiği belirlenmiştir. VIL-10, antijen sunumu yapan hücrelerin; etkeni işleme ve sunum kabiliyetini zayıflatarak dolaylı olarak Th1 hücre aktivasyonunu da baskıladığı bildirilmiştir. Ayrıca, orta düzeyde immün aktivasyonu indükleyerek immün stimülatör etki de yaratabilmektedir (Zhang ve ark., 2015).

1.4. Sınıflandırma

PPV'ların sınıflandırılması çok yavaş ilerlemiş ve kullanılan terminoloji üzerinde çok fazla karışıklık meydana gelmiştir (Robinson ve Lyttle, 1992). Uzun süre Poxvirus olarak sınıflandırılmamışken (Downie ve Dumbell, 1956), Andrewes ve Pereir (1964) yazdığı "Omurgalıların Virusları"nda günümüzde PPVlar olarak tanıdığımız üç virüsü, Grup II Poxviruslar olarak listelemiştir. Bu üç virüsün neden olduğu hastalıklar; ORF hastalığı (bulaşıcı püstüler dermatit, koyunların bulaşıcı ektimasi, bulaşıcı püstüler stomatit, enfeksiyöz labiyal dermatit), sağımcı nodülleri (Pseudocowpox, Paravaccinia) ve sığırların stomatitis papulosası (Bovine papular stomatitis) olarak belirtilmiştir. Anılan bu hastalıklarla ilişkili viruslar, benzer bir

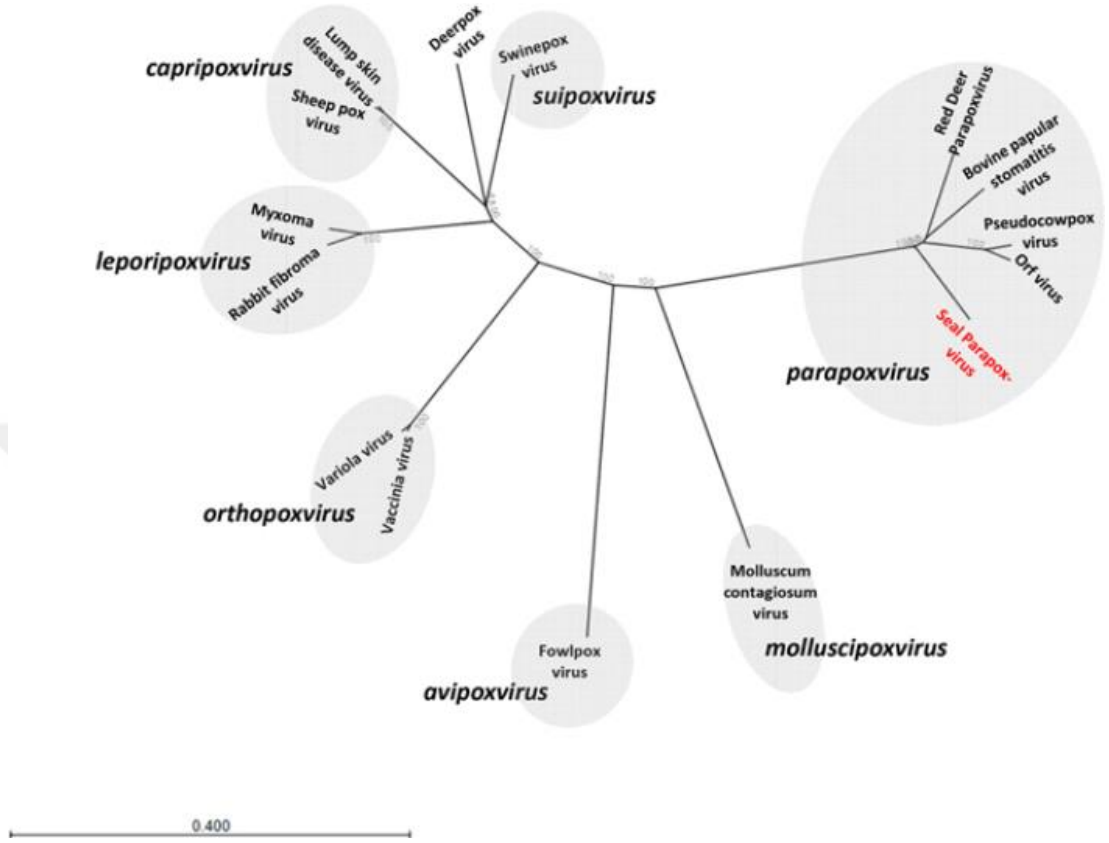
morfolojiye sahip olduklarından önceleri ayrımları net olarak yapılamamış, daha sonraları 1971 yılında Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından, belirtilen bu hastalıkların Poxviruslar içinde ayrı bir grup olarak sınıflandırılması ve sığır papüler stomatit virusu, sağımıcı nodülleri virusu yanısıra, ORF virusunu da içermesine karar verilmiştir (Wildy, 1971) (Çizelge 1.1). 1976'da ICTV (Fenner, 1976), alt grup olan Parapoxvirusları (PPV), *Poxviridae* ailesi, *Chordopoxvirus* alt ailesi, *Parapoxvirus* genusu üyeleri olarak klasifiye etmişlerdir. PPV'lar, insanları da enfekte eden çift tırnaklıların virusları olarak tanımlanmış, temsil eden prototip olarak ORF virusu (ORFV) seçilmiştir. Günümüzde PPV ICTV sınıflandırması; Koyun ve keçilerin püstüler dermatitis virusu/Ecthyma contagiosum/ORFV, Bovine papüler stomatit virusu (BPSV), Pseudocowpox virusu (PCPV) ve Yeni Zelanda'daki Alageyik Parapoxvirusunu (PVNZ) da içermektedir. Cinsin diğer üyeleri arasında fok ve develerin PPV'ları da bulunmaktadır (Fauquet ve ark, 2005) (Şekil 1.3).

PPV'ların sınıflandırılmasında kullanılan bazı özellikler arasında, elektron mikroskobu ile görülen ayırt edici virion morfolojisi, genomun ve konakçı aralığının yüksek G+C içeriği yer almaktadır. Günümüzde ise Polymerase Chain Reaction (PCR) teknikleri ile elde edilen nükleik asitlerin sekans analizi ile diğer Poxvirus türlerinden ayrımı yapılarak, PPV cinsine yeni virusların dâhil edilmesi gerçekleştirilmektedir.

Çizelge 1.1. Poxviridae ailesine ait genusların sınıflandırılması

(Damon, I. K., 2007; Moss, B., 2007 ve ICTV 2019 <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Subfamily	Genus	Species of Interest	Host Range	Host Species	Disease / Pathology	Mortality	Transmission	Morphology	dsDNA Genome Size
Chordopoxvirinae	Avipoxvirus	Fowlpox virus	Medium	Birds	Skin lesion	Medium – High	Arthropods	Brick-shaped	~260 kb
	Capripoxvirus	Sheeppox virus	Narrow	Sheep	Varied, skin lesion, generalize infection	Medium	Arthropods	Brick-shaped	~150 kb
	Cervidpoxvirus	Mule deerpox virus		Mule deers					
	Crocodylidpoxvirus	Nile crocodilepox virus		Reptiles					
	Leporipoxvirus	Myxoma virus	Medium	European and American rabbit	Myxomatosis skin lesion	High - low	Arthropods	Brick-shaped	~140 kb
	Molluscipoxvirus	Molluscum contagiosum virus	Medium	Primates, Humans	Localized tumors	Low	Contact	Brick-shaped	~180 kb
	Orthopoxvirus	Variola virus	Narrow	Humans	Smallpox	High	Inhalation	Brick-shaped	~200 kb
		Cowpox virus	Broad	>30 species	Localized skin lesions	Low	Contact		
		Vaccinia virus	Broad	Man, mouse, cow	Localized skin lesions	Low	contact		
		Monkeypox virus	Broad	Man, monkey, squirrel	Monkeypox	High	Inhalation / contact		
		Ectromelia virus		Rodents					
	Parapoxvirus	Orf virus	Medium	Sheep, goats, ruminants, humans	Localized skin lesions	Low	Contact	Ovoid	~140 kb
		Red deer poxvirus		Red deer					
		Pseudocowpox virus		Cattle, Humans					
		Bovine popular stomatitis virus		Cattle, Humans					
	Suipoxvirus	Swinepox virus	Narrow	Pigs	Localized skin lesions	Low	Arthropods	Brick-shaped	~146 kb
	Yatapoxvirus	Yaba monkey tumor virus	Medium	Primates, humans	Benign tumors, localized skin lesions	Low	Arthropods	Brick-shaped	~145 kb
Entomopoxvirinae	Alphaentomopoxvirus	Melontha melontha		Coleoptera				Ovoid	~260-370 kb
	Betaentomopoxvirus	Amsacta moorei		Lepidoptera, Orthoptera				Ovoid	~232 kb
	Gammaentomopoxvirus	Chironimus luridus		Diptera				Brick-shaped	~250-380 kb



Şekil 1.4. Poxvirusların 47 proteine dayalı filogenetik ağaç analizi (Günther ve ark, 2017).

Karşılık gelen SePPV dizisi, 14 temsili genomun tümünün dizileri ile SePPV protein dizisi uzunluğunun en az %90'ı üzerinde BLASTP hizalamaları verilerine göre, protein dizilerinin korunduğu kabul edilmiştir. Kullanılan sekanslar: Red Deer Parapoxvirus (PVNZ) HL953 (NC_025963.1); ORFV (AY386264.1); PCPV (NC_013804.1); BPSV (NC_005337.1); Vaccinia Virusu (NC_006998.1); Variola Virusu (NC_001611.1); Miksoma Virusu (NC_001132.2); domuz çiçeği virusu (NC_003389.1); geyik çiçeği virusu (NC_006966.1); koyun çiçeği virusu (NC_004002.1); yumrulu cilt hastalığı virusu (NC_003027.1); kümes çiçeği virusu (NC_002188.1); tavşan fibroma virusu (NC_001266.1); molluscum contagiosum virusu (NC_001731.1).

1.5. Epidemiyoloji

ORFV, BPSV ve PCPV dünya çapında koyun, keçi ve sığır yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede ve coğrafyada bulunmaktadır (Buttner ve Rziha, 2002 ve Robinson ve Lyttle, 1992). Deve, fok ve geyik gibi farklı türlerde de PPV enfeksiyonuna dair raporların sayısının artmış olması, PPV'ların önceki yıllara göre düşünülenden daha geniş bir alana yayılmış olduğunu ortaya koymaktadır.

Farklı türlerde PPV enfeksiyonlarının yayılması ve devamlılık arz etmesinin, virionların evre şartlarına dirençli doğası ve reenfeksiyona karşı kısa ömürlü bağışıklık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Robinson ve Lyttle, 1992). PPVlar, koyun, keçi, deve, Japon geyik türleri (*Japanese serow*), Misk kz, Ren geyiği ve foklar dahil olmak üzere çok çeşitli türleri enfekte edebilirler (Hasheminasab ve ark., 2016). Ayrıca PPV'lar zoonotik enfeksiyonlara da neden olarak enfekte hayvanlarla temasta bulunan insanlara da bulaşabilirler. En sık rapor edilen enfeksiyon, koyun ve keçilerde görülen *Ecthyma contagiosum* (sinonim isimleri: Orf, bulaşıcı püstüler dermatit) (Moore, 2008) olup, insanlarda sınırlı cilt lezyonlarına neden olabilmektedir. PPV'ların tarihsel olarak en iyi bilineni ise; sığırda meme başında mevcut olan ve insanda sağımcı nodülleri hastalığını meydana getiren *Pseudocowpox virus*'tur. Ayrıca bu lezyonlar, PPV ile enfekte foklarla temas eden insanlarda da tanımlanmıştır (Clark ve ark., 2005 ve Hicks ve Worthy, 1987).

ORFV genellikle 1 yaş altı genç hayvanları enfekte eder, doğum sonrası süt emme döneminde alınan virus birkaç haftalık/aylık kuzu ve oğlakları etkilemektedir (Lloyd, 1996 ve Reid, 1991). Kuzular süt emme sırasında virusu enfekte koyunların memelerinden alabilmektedir (Reid, 1991). Erişkin hayvanlar da enfekte olabildiğinden, yılın her döneminde salgınlar gözlemlenmektedir. Sr bazında morbidite %90'a ulaşabilirken, mortalite genellikle düşük kalmaktadır. Enfekte sürüde bulaş hızlıdır ve etkilenen hayvanlarla direkt temas veya virus yükü yüksek kabuk

materyalinin merayı kontamine etmesiyle gerçekleşir (Blood ve ark, 1983 ve Lloyd, 1996). Virus, kronik enfekte olan hayvanlarda uzun süre canlı kalabilir (Greig ve ark, 1984; McKeever, 1984 ve Reid, 1991).

Japon geyiklerinin (*Capricornis crispus* ve *Cervus nippon centralis*) PPV enfeksiyonlarının prevalansının araştırıldığı bir çalışmada (Inoshima ve ark., 2001), PPV'ların Japonya'da yaygın olduğunu göstermektedir. Japonya'da sirküle olan izolatların karakterizasyonu, bunların ORFV olduklarını göstermiştir (Inoshima ve ark., 2001). Ausdk veya deve bulaşıcı ektiması olarak adlandırılan develerin PPV hastalığı ilk olarak 1972'de Sovyetler Birliği'nde tanımlanmıştır (Rosliakov, 1972). Hastalık etkeninin varlığı, Moğolistan (Dashtseren ve ark., 1984 ve Jezek ve ark., 1983), Somali (Maollin ve Zessin, 1988), Kenya (Munz ve ark., 1986) ve Libya'da (Azwai ve ark., 1995) rapor edilmiştir. Kenya'nın Türkans bölgesindeki salgınlar sadece deve buzağlarında (*Camelus dromedaries*) tespit edilmiştir (Gitao, 1994). Deve buzağlarında ölüm, deve çobanlarının karşılaştığı en ciddi sorunlardan biri olduğu ve develeri enfekte eden PPV'larının ORFV olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, koyunlarda da develerde görülen bulaşıcı ektima vakaları bildirilmiş (Hartung, 1980), Libya'da enfekte develerin serolojik analizinde, bu enfeksiyonların da ORFV'den kaynaklanabilme ihtimalinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Azwai ve ark., 1995).

Ren geyiği (*Rangifer tarandus tarandus*) PPV'ları, Finlandiya ve Norveç'te bildirilmiştir. 1992-93 kışında Finlandiya'da yaklaşık 400 Ren geyiğinin öldüğü ve 2800'ünün klinik hastalık belirtileri gösterdiği şiddetli bir salgın meydana gelmiştir (Buttner ve ark., 1995). Tikkanen ve ark., (2004) sporadik salgınlar rapor etmişlerdir. Finlandiya'da Ren geyiklerinden elde edilen virusların analizi, bir hastalık salgınının ORFV'tan ve diğerinin ise PCPV'den kaynaklandığını göstermiştir.

Norveç'te yarı evcilleştirilmiş Ren geyiklerinde PPV enfeksiyonları bildirilmiştir (Tryland ve ark., 2001). Norveç'teki PPV enfeksiyonlarının muhtemelen ORFV'tan kaynaklandığı bildirilmiştir (Klein ve Tryland, 2005). Bir ORFV suşu olan

NZ2'nin (ORFVNZ2) ve Ren geyiği izolatlarının RFLP testi, rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA analizi ve spesifik genlerin kısmi DNA dizilimi kullanılarak yapılan genomik karşılaştırmaları, Ren geyiği viruslarının ve bilinen ORFV suşları ile yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiş, virusun koyun ve keçilerden Ren geyiğine; insan, ekipman ve mera/ağulların ortak kullanımı yoluyla aktarılmış olabileceği rapor edilmiştir.

PVNZ, bilinen diğer PPV türlerinden oldukça farklıdır. Yeni Zelanda'daki Alageyiklerin 19. yüzyılda Avrupa'dan getirilen hayvanlardan elde edilmesi ve bu ülkeye özgü yerel bir çift tırnaklı türü olmaması, yalnızca Yeni Zelanda'da rapor edilen bir PPV türü olan PVNZ'nin aslında Avrupa orijinli olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Horner ve ark., 1987 ve Robinson ve Mercer, 1995). PVNZ'nin diğer ülkelerde de mevcut olabileceği, Avrupa'dan rapor edilen son yıllardaki çalışmalarla gösterilmiştir (Scagliarini ve ark., 2012). Deerpox virusunun tam genom dizisinin belirlenmesi, bunun yeni bir cinsi temsil etme olasılığının yüksek olduğunu ve PVNZ'den farklı olduğunu doğrulamıştır (Afonso ve ark., 2005).

Fok ailesinin ve diğer yüzgeçayaklı deniz memelilerinin PPV'larıyla enfekte olduğu bilinmektedir. İlk rapor 1969'da yayınlanmış ve Kaliforniya deniz aslanlarının (*Zaophus californianus*) enfeksiyonunu tanımlanmıştır (Wilson ve ark., 1969). İlk çalışmalar genellikle lezyonların histopatolojisi ve virus partiküllerinin elektron mikroskobu ile sınırlıyken, PPV özgü DNA problemleri ile in situ hibridizasyon ve PCR ürünlerinin sekans analizini içeren güncel raporlar bildirilmektedir (Toplu ve ark., 2007). Ortaya çıkan tablo, yüzgeçayaklıları enfekte eden viruslar PPV cinsi içinde bir veya daha fazla yeni türün oluşmasına imkân sağlamakta olup, yüzgeçayaklılar ile çift tırnaklılara ait PPV'ların konakçıya özgü bazı farklılıkları bulunmaktadır.

Türkiye'de PPV enfeksiyonlarının varlığına ve yaygınlığına dair çok sayıda literatür bilgi mevcuttur. İlk virus izolasyon çalışmaları 1973 yılına dayanmaktadır (Ergin ve Köklü, 1973). Ankara ili Elmadağ ilçesinde enfekte koyun sürüsünden alınan

bir sürüntü materyalinden kuzu böbrek hücre kültüründe virus izolasyonu yapılmış olup (Burgu ve Toker, 1984), İzmir bölgesinde 1979-1980 yılları arasında insanlarda vaka bildirimleri bulunmaktadır (Güneş ve ark., 1982). Ülkemizde ORF viruslarının moleküler karakterizasyonuna ilgili çalışmalar sınırlı sayıda olup, genellikle B2L gen bölgesinin dizin analizlerine yoğunlaşmıştır (Gulyaz ve ark, 2020; Oğuzoğlu ve ark, 2014 ve Şevik, 2019).

1.6. Virus Replikasyon Mekanizması ve Patogenez

1.6.1. Virusun dokuya girişi

Doğrudan temas veya fomitler ile nakledilebilen PPV'ların, hasarlı deriden organizmaya girdiği rapor edilmiştir. Enfekte hayvanların salyası ile virusun saçılabilirdi ifade edilse de, oral lezyonlarla transfer edilip edilemediği halen belirsizdir (Petersen ve Damon, 2014). Virus genellikle derideki sıyrık, çizik ve yaralardan bulaşır. Enfeksiyon bölgelerinde gözlenen klinik patoloji tipik olarak püstül ve kabuk oluşumudur (Munz ve ark, 1986; Robinson ve Lyttle, 1992 ve Wilson ve ark., 1969). Genel olarak, memelilerin PPV enfeksiyonunun makroskopik lezyonları, epitel ve oral mukoza ile sınırlı olsa da, PPV'ların sistemik olarak yayılabileceği de bilinmektedir (Robinson ve Lyttle, 1992).

ORFV, klinik olarak sağlıklı görünümlü kronik enfekte koyunlar tarafından da nakledilebilmektedir. Yapağıda uzun süre canlı kalabilen virus, kabuk materyalinde 12 yıla kadar varlığını sürdürebilmektedir. Genellikle epitel mukozada lokalize kalır (Petersen ve Damon, 2014). Asemptomatik keçilerden alınan tam kan örnekleri ile yapılan bir çalışmada (Cheng ve ark., 2018), bu hayvanlarda hiçbir klinik bulgu olmamasına rağmen ORFV taşıyıcısı olduklarına dair kanıt bulunmuştur. Oluşan papüller, veziküller veya püstüller; dudaklarda, genital organlarda ve ayaklarda (koroner bantlar) kabuklanma ile karakterizedir. Lezyonlar en sık olarak mukokutanöz kavşaklarda gelişir ve en sık ağız kenarlarında bulunur. Labial form; genellikle bir

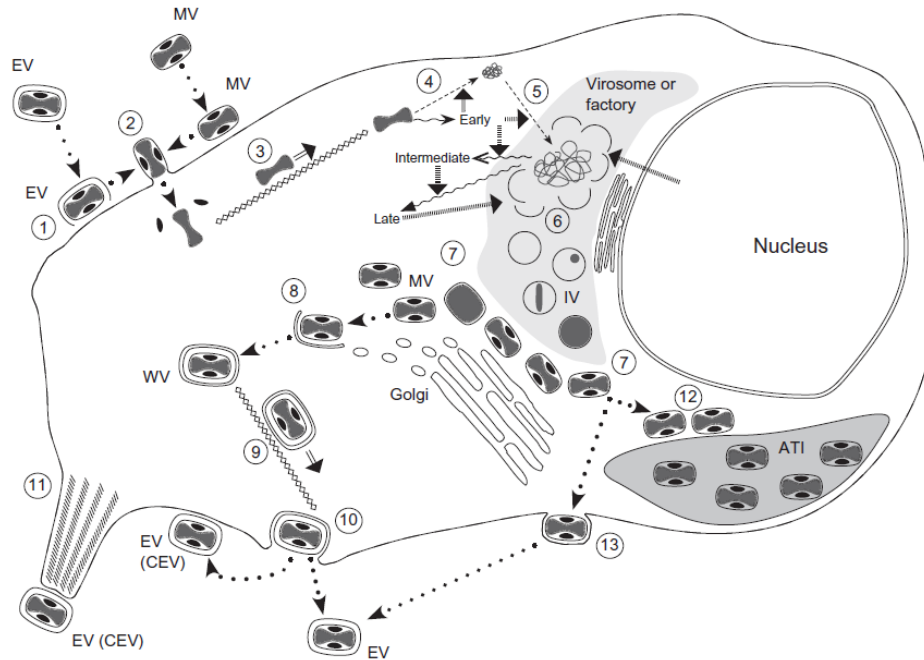
yaşından küçük hayvanlarda, kuzular ve oğlaklarda tanımlanmaktadır. Enfeksiyonda morbidite oranı %90'ı geçebilmektedir. Genç hayvanlarda mortalite bazan %50'lere varabilmekle birlikte, erişkin hayvanlarda mortalite düşüktür. Hastalığın seyri 6 haftaya kadar uzayabilir. Sahada tanı karakteristik lezyonlara dayalı olarak klinik bulgulara göre yönlendirici olmakla beraber, kesin tanı için laboratuvar teşhisi gereklidir (Underwood ve ark., 2015).

ORFV lezyonları genellikle dermisin epidermal kısmına doğru aşağı büyümeler sergiler. Bu, özellikle birincil lezyonlarda belirgindir. Diğer bir karakteristik özellik, geniş kapiller dilatasyon ve proliferasyondur. ORFV lezyonları, virusla enfekte olmuş hücrelerin altında ve bitişiğinde yoğun bir immün ve inflamatuvar hücre birikimi içerir. Bunlar arasında nötrofiller, lenfositler (T ve B hücreleri) ve MHC II kompleksi antiijenleriyle yoğun şekilde boyanan dendritik hücreler bulunur (Mahy ve Van Regenmortel, 2008).

PPV lezyonları, makul, papul, vezikül, püstül, kabuklanma ve rezolüsyon aşamalarından geçer. Enfeksiyon, organizmaya giriş yerinin çevresinde kızarıklık ve şişlik olarak başlar ve 24 saat içinde küçük veziküller gelişir. Lezyonlar geliştikçe püstüler bir görünüm alırlar. Lezyonların püstüler doğası, geniş bir polimorfonükleosit infiltrasyonundan kaynaklanmaktadır. Bitişik lezyonlar, hastalık ilerledikçe bir kabuk oluşturarak birleşebilir. Kabuklu lezyonların altındaki dermiş tabakası, ödemli ve proliferatif hale gelir, bu da lezyona granülomatöz bir görünüm verir. Kabukların kalkması ve çatlaması kanamaya neden olabilir. Genellikle lezyonların iyileşmesi 4-6 hafta kadar sürer. Yeni Zelanda'daki Doğu Friesian koyunlarda oldukça büyük tümör benzeri büyümeler ve şiddetli ORFV kalıcı enfeksiyonu vakaları rapor edilmiştir. Şayet immün sistemin yetersizliği söz konusu ise ki bu durum genç hayvanlarda sıklıkla görülebilir, vücutta olağan dışı yerlere yayılma/generalize olma ve/veya uzun süreli ORF enfeksiyonu şeklinde ortaya çıkabilir, hatta bir oğlakta uzun süreli (6 ay) bulaşıcı ektima vakası bildirilmiştir (Abu Elzein ve Housawi, 1997).

1.6.2. Virus replikasyon siklusu

Deri, memelileri yaralanmalardan ve enfeksiyonlardan koruyan en büyük organdır. Keratinositler, epidermis içerisindeki hücrelerin yaklaşık yüzde doksanını oluşturur ve derinin bağışıklık nöbetçileri olarak gelişmiştir. ORFV, hasarlı deriden giriş yaparak keratinositleri ve oral mukozadaki epitelyal hücreleri enfekte ederek, epidermal keratinositlerin rejenerasyonuyla replike olabilen, oldukça epitelyotropik bir virus olarak bilinmektedir (Fleming ve ark., 2015). Ayrıca bu virus, yoğun enflamatuvar ve çoklu konakçı bağışık yanıtı varlığında bile, tekrarlayan ve kalıcı enfeksiyonlara neden olma yeteneğine de sahiptir (Abu Elzein ve Housawi, 1997). Viral replikasyon mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, genel replikasyon mekanizması şekil altı yazısında verilmiştir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Parapox virusu yaşam döngüsü (Fenner, 1999).

Poksvirusların enfeksiyöz döngüsü, Vaccinia virus esas alınarak çizilmiştir: ATI, A tipi inklüzyon gövdesi; IV, olgunlaşmamış virion; MV, olgun virion; WV, sarılmış virion; EV, zarflı virion; CEV, hücre ile ilişkili zarflı virion. (1) Hücre yüzeyi reseptörlerine bağlandıktan sonra EV zarfının bozulması, esas olarak çıplak MV gibi çıplak çekirdeği ve yan gövdeleri serbest bırakmak için doğrudan hücre veya endozom zarı ile birleşebilen MV'yi (2) ortaya çıkarır. Çekirdek (3) mikrotübüller boyunca perinükleer bölgeye taşınır. Erken genler, doğrudan bozulmamış çekirdekten ifade edilir (dalgalı oklar); erken gen ürünleri, (4) çekirdeğin soyulmasına, (5) viral DNA replikasyonuna ve ara gen ekspresyonuna aracılık

eder. Ara gen ürünleri, geç gen ifadesine aracılık eder. Geç gen ürünleri yapısal proteinleri (erken gen ekspresyonu için gerekli polimeraz dahil) ve morfogenez için gerekli proteinleri içerir. Tek zar hilalleri, IV oluşturan viral çekirdek proteinleri ve genomik DNA'yı çevrelemek için birleştirilir (6). Bu olgun (7)'den MV'ye, Golgi/endozomal bölme taşıyan (8) WP üretmek için çift zarla sarılır. Bunlar (9) mikrotübüller boyunca hücre yüzeyine taşınırlar, burada (10) ekzositoz yaparlar ve EV oluşturmak için iki ek zarın dışını kaybederler. EV hücre yüzeyinde CEV olarak kalabilir veya ortamda serbest kalabilir. CEV (11), aktin güdümlü projeksiyonların uçlarında hücreden uzağa itilebilir. Bazı çiçek viruslerinin MV'si (12) alternatif olarak ATI'ye taşınabilir ve ATI'ye dahil edilebilir. Avipoxviruslar, önemli ölçüde WV oluşturmuyor gibi görünmektedir; daha ziyade EV üretimi, hücreden çıkmak için tomurcuklanma geçirdikleri plazma zarına MV taşınmasını içerir (13).

1.7. ORFV Enfeksiyonuna Karşı Oluşan İmmun Yanıt Mekanizması

1.7.1. ORFV enfeksiyonlarının neden olduğu immün yanıtlar

Özelleşmiş hücreler, dokular ve organlardan oluşan bağışıklık sisteminin amacı, konağı mikroorganizmalardan ve/veya bu mikroorganizmalar tarafından üretilen toksik ürünlerin etkilerinden korumaktır (Janeway ve Medzhitov, 2002 ve Nash ve ark., 2006). ORFV enfeksiyonuna karşı meydana gelen immün yanıt, hem doğal hem de adaptif yanıtlardan oluşur (Achen ve ark., 1998). Bugüne kadar ORFV enfeksiyonuna karşı immün yanıt üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, virus ile konak etkileşimine dair birçok mekanizma günümüzde hala net olarak anlaşılamamıştır (Balamurugan ve ark., 2014 ve Ni ve ark., 2013).

Bununla birlikte, ORFV duyarlı bir konakçıya bulaştığında, konak bağışıklığını zayıflatarak çoğalır (Zahoor ve ark., 2016). Viral patojen organizmaya girdiğinde; nötrofil lökositler, MHC sınıf II-dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından fagosite edilebilmek üzere enfeksiyon bölgesine göç şekillenir. Bu durum yakalanan antijenlerin, yeni toplanan genç T hücrelerine ve hafıza hücrelerine antijen sunumunun gerçekleştiği periferik lenf düğümüne göçünü kolaylaştırır (Chung ve ark., 2016, Weber ve ark., 2013 ve Zahoor ve ark., 2016). Dendritik hücreler, daha fazla çoğalma (Weber ve ark., 2013) için konak içine giriş yapmış virusun lenf düğümlerine taşınmasını ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), interlökin-1 β (IL-

1b), interferon-a (IFN-a) ve IL-8 ve IFN-y gibi özel sitokinlerin sunumunu kolaylaştırır. Doğuştan gelen bağışıklık hücresi alımının yanı sıra, enfekte olmuş konakçı hücrelerle ilişkili en yaygın adaptif bağışıklık B-hücresi, CD4+ ve CD8+ T-hücresi aracılı bağışıklık tepkileridir (Chen ve ark., 2020). Bununla birlikte, aktive edilmiş T-hücresi bağışıklığı bu antijenleri yok edememektedir. Bunun sebebi; virusa ait yapısal proteinlerin olası nötralizasyonu önleyen birkaç virulans faktörü salgılamasıdır (Grunathan ve ark., 2000).

1.7.2. ORFV Enfeksiyonuna Karşı Doğuştan ve Adaptif İmmun Yanıt

Doğuştan gelen bağışıklık, istilacı bir virusa karşı savunma mekanizmasının ilk şeklidir ve immunolojik hafıza eksikliği nedeniyle spesifik olmayan bir yanıt olarak kabul edilir (Delany ve ark., 2014; Förster ve ark., 1994; Haig ve ark., 1996 ve Haig ve ark., 2002). Bunun yanında, ORFV güçlü immun modülatör aktivitelere sahiptir (Plotkin, 2014) ve bir dizi virulans faktörünü yapısında barındırarak bağışıklık sisteminden kaçmak için bir strateji geliştirmiştir (Buddle ve ark., 1984). Virus, komplement, kemokiner interlökinler, inflamasyon, interferonlar (IFN) ve tümör nekroz faktörleri dahil olmak üzere çok sayıda spesifik olmayan aracı savunmayı hedefler (Fenner, 2000 ve Förster ve ark., 1994).

Doğuştan gelen immun yanıtın yanındaki bir diğer önemli savunma mekanizması da antikor aracılı ve hücre aracılı yanıtları içeren adaptif savunma mekanizmasıdır (Fenner, 2000 ve Smith ve ark., 1998, Zhao ve ark., 2010). Adaptif bağışıklık, viral antijenleri tutan (Johnston ve Mcfadden., 2003; Martins ve ark., 2014 ve McLane ve ark., 2019) ve bağışıklık sistemi adaptasyonunu belirli bir antijene uyarlayarak (Mercer ve ark., 1994) konakçı hücrenin tanınmasını destekleyen hücre aracılı ve antikor aracılı yanıtlar olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalar, T hücrelerinin ORFV'ye karşı koruyucu bağışıklığın ortaya çıkmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Friebe ve ark., 2004 ve Smith ve ark., 1998). Bununla birlikte, virusun duyarlı konağı tekrar enfekte etme yeteneği, ORFV antijeninin yararına bir aşırı

duyarlılık reaksiyonu olarak arzu edilen bellek T hücrelerinin üretimi ile ilişkili görünmemektedir (Barry, 2015; Boughton ve Hardy, 1935; Förster ve ark., 1994 ve Smith ve ark., 1998). Bu nedenle, CD8+ sitotoksik T-hücreleri ve/veya B-hücresi yanıtı ile karşılaştırıldığında, enfekte hayvanlar arasında önemli seviyelerde CD4+ T-hücreleri saptandığından, böyle bir bağışıklık tepkisi ORFV enfeksiyonu için anormal olarak kabul edilemez (Deane ve ark., 2000; Small ve ark., 2019 ve Umer ve ark., 2020).

Diğer yandan, humoral immun yanıt, hayvanları ORFV enfeksiyonundan korumada önemli bir rol oynamaz (Bhanuprakash ve ark, 2012). ORFV ile enfekte olmuş koyunların serumlarında bir miktar antikor titresi saptanması, antikorların koyunlardan kolostrum yoluyla yavrularına geçişi (Deane ve ark, 2000 ve Mercante ve ark, 2010) veya enfekte hayvanlardan sağlıklı hayvanlara serum aşılmasının koruyucu bağışıklığı ortaya çıkarmadığı gerçekleştirilen çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Guo ve ark, 2003). Bu nedenle, ORFV'ye karşı humoral bağışıklık uzun ömürlü değildir ve virus hem aşılansın hem de aşılansın koyunları kolaylıkla yeniden enfekte edebilir (Bhanuprakash ve ark, 2012; Hosamani ve ark., 2009 ve Loh ve ark, 2006). Ancak, aşılansın ve yeniden enfekte olmuş koyunlarda daha hızlı iyileşebilen, prognoz yönünden daha küçük lezyonlar gözlemlenmiştir (Bhanuprakash ve ark, 2012; Housawi ve ark, 2012 ve Hu ve ark, 2020). Bu durumun ana nedeni, aşılansın veya önceden enfekte olmuş hayvanlarda ORFV'ye özgü nötralize edici antikorların yokluğu, ORFV'nin konakçısında tekrarlayan yeniden enfeksiyonlara neden olması olarak açıklanmıştır (Bhanuprakash ve ark, 2012 ve Brun ve ark, 2011).

Nötralize edici antikorların eksikliğine ek olarak, ORFV'nin daha önce enfekte olmuş ve/veya aşılansın koyunları tekrar tekrar enfekte etme yeteneği, virus tarafından kodlanan ve konak bağışıklığını geçici olarak baskılayan immun modölatör genlere ve proteinlere atfedilir (Haig ve ark., 1996).

1.8. Klinik Bulgular

PPV'lar epiteliotropik viruslar olarak hasar görmüş deriden enfeksiyona neden olması yanı sıra, solunum kanalı ile de alınarak enfeksiyonlarını meydana getirebilirler. Klinik belirtiler bireyler arasında ve farklı coğrafi bölgelerdeki salgınlara göre değişiklik gösterse de poxvirus enfeksiyonlarının derideki lezyonları genellikle birbirine benzerdir ve genellikle deride lokalize olabilmektedir. Bazen de bukkal mukozada püstüler lezyonlara yol açarlar (Haig ve Mercer, 2008).

Her yaştaki koyun ve keçiler etkilenebilir, ancak hastalık tipik olarak genç ve/veya immünolojik olarak daha naif hayvanlarda daha şiddetlidir. Duyarlı bir koyun sürüsünde bir epizootik, hayvanların %75'inden fazlasını etkileyebilir ve ölüm oranı %50'ye kadar çıkabilir; genç ve/veya saf ırktan koyunlarda vaka-ölüm oranları %100'e yaklaşabilir (Fenner, 2000).

4-12 günlük bir kuluçka döneminden sonra ateş ve solunum sayısında artış, göz kapaklarında ödem, gözyaşı ve burundan mukus akıntısı olur. Etkilenen koyunlar iştahlarını kaybedebilir ve kemerli bir sırtla ayakta durabilirler. Bir ila 2 gün sonra, ciltte ve deri altı bölgede rastgele görünen çapı 1 cm'ye kadar olan papüller (deri nodülleri) gelişir. Enzootik bölgelerde, daha yaygın sunum kuyruğun altındaki birkaç papüldür. Bununla birlikte, duyarlı hayvanlarda papüller, baş, boyun, kulaklar, koltuk altı ve kuyruk altı gibi yünün en kısa olduğu deri bölgelerinde en belirgin lezyonlarla birlikte vücutta geniş bir alana yayılabilir (Fenner, 2000).

Akut hastalığı atlatan hayvanlarda uzun süreli virus tespiti yapılabilir. Klinik olarak: Labial, Podal, Genital ve Malignant (Generalize/İç organ/Visceral) formlar tanımlanmaktadır. Duyarlı sürülerde morbidite oranı %100'e kadar çıkabilir, ölüm oranı genç hayvanlarda (kuzu/oğlak) yüksek olabilmektedir. Hastalığın ekonomik açıdan önemli olup, deri sanayii ve genç hayvanlardaki kayıplara bağlıdır. Ayrıca zoonoz bir enfeksiyon olması nedeniyle de Tek Sağlık konseptine dahildir. PPV türleri ısıya ve kurumaya karşı oldukça dirençlidir. Yemlik ve ahır kirişlerinde günler hatta aylarca aktif kalabilir. Ortak mera kullanımı ile bulaş yüksektir. Ayrıca süt sağım makinalarının ve kırkım aletlerinin hasta hayvanlarda kullanımı da bulaşta önemlidir. İnsanlarda lezyonlar travma bölgesinde oluşur. PPV enfeksiyonunda insandan insana

bulaşma son derece nadirdir (Bloomquist, 2018), ancak meslek hastalığı (Veteriner Hekimler, mezbaha çalışanları, çiftçiler vb) olarak da dikkat edilmesi gerekmektedir.

İnsanlarda klinik belirtiler genellikle enfeksiyondan 3-4 hafta sonra ortaya çıkar. Kendini sınırlayıcı olmakla birlikte, genellikle ellerde ve daha seyrek olarak baş veya boyunda bazen ağrılı olan tek veya çoklu, çapları 6-27 mm arasında değişen deri lezyonları oluşturur. Ayrıca hafif ateş, lenf düğümlerinde şişmesi ve/veya eritema multiforme büllozum ile ilişkilendirilebilir. Prognoz elverişli olup, komplikasyon olmadan 4-6 hafta içinde iyileşme görülmekle birlikte, göz enfeksiyonu sonucu ciddi şekillere yol açabilir. İmmünosupresif durumlarda, yanık veya atopik dermatitten muzdarip insanlarda genişlemiş lezyonlar ortaya çıkabilir. Lezyon iyileşmesi büllöz pemfigoid ile komplike olabilir (Buller, 2017).

Pseudocowpox virusu (PCPV) lezyonları sığırlarda genellikle genital sistem enfeksiyonları şeklinde gözlemlenir. Enfekte hayvanlarda lenf yumrularında şişkinlik gözlenebilir. Lezyonlar, yavaş yavaş regrese olarak 4-6 hafta içinde kaybolur. Sığırlarda, meme ve meme başında lokalize olan bu lezyonlar, kabuklanarak 3-4 hafta süreyle sağımı engellerler. Bu nedenle mastitis görülebilir. Ağız içinde dilde ve diş etlerinde de lezyonlar görülebilir, bazan ülserleşebilir. Bol miktarda virus bulunduran kabuk materyali, ortak sağım makinası kullanımıyla hem diğer hayvanların enfeksiyonu için, hem de özellikle elle sağım yapan insan enfeksiyonları için önemli bir virus kaynağı oluşturur.

BPSV, bugüne dek büyükbaş hayvanlarda bildirilen bir PPV enfeksiyonudur. Ülkemizde de sığırlarda varlığı rapor edilmiştir (Timurkan ve Aydın, 2019). Tıpkı Pseudocowpox enfeksiyonu gibi, meme ve meme başında oluşan klinik bulgular PCPV'den ayırt edilemez. Zoonoz olarak, at nalı şeklindeki tipik lezyonlar nedeniyle insanlarda da enfeksiyon PCPV'ye benzerdir.

1.9. Tanı

Klinik belirtiler tipik olmakla birlikte, virus izolasyonu ve elektron mikroskopi (Damon, 2007; Delhon ve ark., 2004 ve Inoshima ve ark., 2000) tanı için “Gold” metotlardır. Tanı, günümüzde aft materyalinden PCR ile yapılmaktadır. PPV enfeksiyonlarının PCR ile tanısında immün dominant ve korunmuş bir gen bölgesi olan zarf proteinine (*B2L*) spesifik primerler kullanılmaktadır (Sullivan ve ark., 1994).

1.9.1. Virus İzolasyonu

Epiteliotrop özellikte olan Poxvirus gibi virusların üretilmesi için Koriyoallontoik membrana (CAM) ekim duyarlı bir metot olmakla birlikte, günümüzde çok kullanılmayan bir yöntemdir (Oliveira ve ark, 2016). PPV’lar ve molluscum contagiosum virusu dışındaki çoğu Poxvirus, hücre kültüründe kolaylıkla ürer. Moleküler yöntemlerin geliştirilmesi öncesindeki dönemlerde, embriyolu tavuk yumurtası korioallantoik membranındaki inokulasyonlar, *Chordopoxvirus*’ları *Ortopoxvirus*’lardan ayırt edebilmek için kullanılmıştır (Christopher ve ark, 2016). PPV’ların izolasyonu oldukça güç olmakla birlikte duyarlı konakçı orijinli hücre kültürlerinde üretilmektedir (Kottaridi ve ark, 2006). Bu amaçla fetal kuzu böbrek hücre kültürü (Burgu ve Toker, 1984), koyun tiroid hücre kültürü (Ergin ve Köklü, 1973), koyun thymus hücre kültürü (Oğuzoğlu ve ark, 2009), primer kuzu testis hücre kültürleri (Kottaridi ve ark, 2006) kullanılmıştır.

1.9.2. Polimeraz chain reaction (PCR) ile nükleik asit tespiti

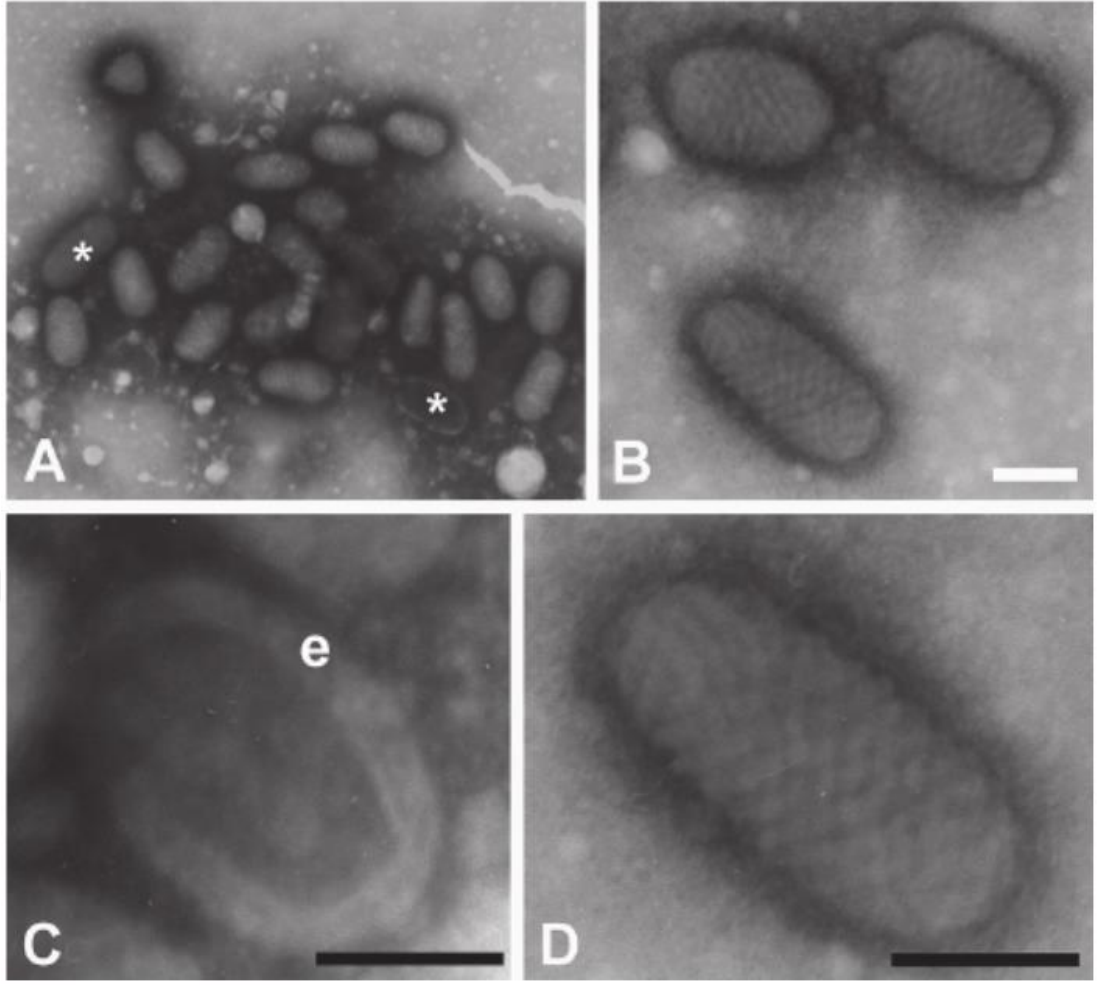
PPV’ların hızlı tanısı için PCR temelli çeşitli analizler bildirilmiştir (Gallina ve ark., 2006; Inoshima ve ark., 2000; Nitsche, 2006 ve Torfason ve Gunadottir, 2002). PCR testi ile tanıda kritik öneme sahip doğruluk, kesinlik ve testin amacına uygunluk ilkelerini sağlamak gibi performans kriterleri arasında bulunan tekrar üretilbilirlik,

kullanıcı değişkenliği ve sağlamlık (robustness) gibi unsurlar tam olarak değerlendirilmemiştir (Jacobson, 1996 ve OIE, 2013).

Amaresh ve ark. (2016) araştırmalarında, PPV'ların hızlı tespiti için oldukça hassas bir TaqMan tabanlı gerçek zamanlı PCR testinin geliştirilmesini, optimizasyonunu ve tam doğrulamasını rapor etmişlerdir. Test, klinik numunelerde PCR inhibitörlerinin saptanmasına ve yanlış negatif sonuçların tanımlanmasına izin veren bir dahili pozitif kontrol (IPC) olarak beta-aktin kullanılarak oğullanmıştır.

1.9.3. Elektron mikroskobi (EM)

EM kullanılarak direkt PPV tanısı yapılmaktadır (şekil 1.6). Çoğu PPV'larının morfolojisi, tanımlamak ve bilinmeyen bir virusu doğru aileye atamak için yeterince karakteristiktir. Yöntem, kesin bir teşhis sağlayabilir (Fenner, 2000). Kültürde üretimi uzun süren ve kültüre edilemeyen Poxvirusların hızlı ve kesin tanısında EM “Gold” test olarak kullanılır (Field, 1982).



Şekil 1.6. Deri lezyonundan kazıntı preparatta PPV partiküllerinin elektron mikrografileri (Kitchen ve ark, 2013).
(A) Çok sayıda PPV. (B – D) Parapox virusların daha yüksek büyütme oranları. Kalın viral zarf (e, C'de) açıkça tanınabilir. Ölçek çubukları 100 nm olup, virusun yaklaşık büyüklüğünü göstermektedir.

Bu tez çalışmasının amaç ve kapsamı aşağıda özetlenmiştir:

- PPV enfeksiyonu yönünden 2003 ila 2021 yılları arasında pozitiflik saptanan arşiv materyallerinde (n=9) yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları ile viral genomun 4 farklı bölgesine spesifik dizinlerin kazanılması ve GenBank veri tabanına işlenmesi hedeflenmiştir.
- İlgili gen bölgeleri yönünden pozitif bulunan ampikonların sekans analizi ile elde edilen dizinlerinin, NCBI-GenBank veri tabanında bulunan dizinlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.
- Ülkemize ait PPV'ların dünyadaki hem cinsleri ile benzerlik ve farklılıklarının ortaya koyulabilmesi için, gen bölgelerine spesifik dizinlerin filogenetik analize tabii tutulması diğer bir çalışma hedefini oluşturmaktadır.
- Sahada sirküle olan PPV suşlarına yönelik retrospektif bir bilgi kazanımı amaçlanmış olup, hastalığa neden olan virusların yıllar içerisindeki değişimleri ve mutasyonları hakkında fikir sahibi olunması hedeflenmiştir.
- Enfeksiyonlarla mücadelede sahada sirküle olan virusların moleküler karakterizasyonlarının yapılması önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasının nihai hedefi olarak; oluşabilecek mutasyonların yıldan yıla, coğrafyadan coğrafyaya ve türden türe farklılıkları olabileceği ihtimalinden hareketle, PPV enfeksiyonları ile mücadelede seçilecek yolun belirlenmesinde katkı sağlayacak sonuçların elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Örnekler

Yüksek lisans tez çalışması, 16.02.2022 tarihli, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (toplantı no:2022-4, dosya no:2022-28, karar no: 2022-4-44) izni ile yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, 6 adet kabuk materyali, 1 adet organ materyali, SFT-R hücre kültüründe üretilen 2 adet virus izolatı ve 1 adet referenz virus suşu kullanıldı.

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden 2003 ve 2021 yılları arasında koyun (n=7) ve keçilerden (n=2) elde edilen Ankara Üniversitesi Viroloji Anabilim Dalı arşiv materyallerinden faydalanıldı. Örneklerin alındığı iller ve hayvanlara ait bilgiler Çizelge 2.1'de verildi.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan arşiv materyali ve 1 adet referenz suşa ait bilgiler

<i>Numune adı</i>	<i>Numune türü</i>	<i>Konakçı</i>	<i>Coğrafi orijin</i>
TR-ORF-İzolat-2003	İzolat	Keçi	Kırıkkale/Türkiye
TR-ORF-2007	Kabuk materyali	Keçi	Şanlı Urfa/Türkiye
TR-ORF-İzolat-2019.1	İzolat	Koyun	Aydın/Türkiye
TR-ORF-2019.2	Organ, Akciğer	Koyun	Aydın/Türkiye
TR-ORF-2020.1	Kabuk materyali	Koyun	Konya/Türkiye
TR-ORF-2020.2	Kabuk materyali	Koyun	Konya/Türkiye
TR-ORF-2020.3	Kabuk materyali	Koyun	Konya/Türkiye
TR-ORF-2021.1	Kabuk materyali	Koyun	Çankırı/Türkiye
TR-ORF-2021.2	Kabuk materyali	Koyun	Çankırı/Türkiye
D1701	Referenz virus	Koyun	Almanya

2.1.2. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılmak üzere temin edilen kimyasal ve sarf malzemeleri aşağıda listelendi.

1. Taq DNA Polymerase
2. 10X Buffer
3. 25 mM MgCl₂
4. 10 mM dNTP Miks
5. Forward Primerler (Dört farklı gen bölgesi yönünden)
6. Reverse Primerler (Dört farklı gen bölgesi yönünden)
7. DW
8. Pipet tipleri
9. Pipet p10
10. Pipet p100
11. Pipet p1000
12. Nitril eldiven medium
13. Agaroz
14. Water - Molecular biology grade
15. PBS Solution
16. TAE Solution %0,5
17. Mikrosantrifüj Tüpü

2.1.3. Primerler

Tez çalışmasında kullanılan primerler Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler.

Bölge	Primer Adı	Oligonükleotit Dizileri	bp	Kaynak
ORFV011	B2L F	5' - GCGTCCCTGGCGCAGGGCAA- 3'	1067	Bu çalışma için dizayn edildi
	B2L R	5' -TTAATTTATTGGCTTGCAGAA- 3'		
ORFV059	F1L F	5'-ATGGATCCACCCGAAATCAC-3'	1029	Zhang ve ark., 2015
	F1L R	5'-TCACACGAT GGCCGTGACCAG-3'		
ORV020	VIR F	5' -ATGGCCTGCGAGTGCGCGTC- 3'	552	Pravas Sahu ve ark., 2022
	VIR R	5' -GCCGCAGTTGTTGATGAGGAT- 3'		Bu çalışma için dizayn edildi
ORFV127	vIL-10 F	5'-CAATT GGAATGTCTGAAGAAC-3'	480	Zhang ve ark., 2015
	vIL-10 R	5'-AGCAGAACGATACGAGAATCCGAAC-3'		

2.1.4. Cihazlar

Tez çalışmasındaki araştırmalarda Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarı bünyesinde bulunan cihazlar kullanılmıştır.

1. Holten Biyolojik Güvenlik Kabini
2. Biometra Thermal Cyclers (Jena, Germany)
3. Bio-Rad Thermal Cyclers
4. Sartorius Hassas Terazî
5. Mikrodalga Fırın
6. Elektroforez Sistemi
7. Soğutmalı Santrifüj
8. PicoDrop Spektro-fotometre
9. Class II Biyogüvenlik kabini

10. Kodak Gel Logic 2200 Imaging System
11. Vortex
12. +4 °C Buzdolabı
13. -20 °C Derin dondurucu
14. -80 °C Derin dondurucu



2.2. Yöntem

2.2.1. Viral Nükleik Asit İzolasyonu

Türkiye'nin farklı bölgelerinden 2003-2021 yılları arasında elde edilmiş olan 9 adet arşiv materyalinin ve 1 adet referenz virusun ekstraksiyonu konvansiyonel fenol:kloroform:izoamil alkol metodu (25:24:1) (Sambrook ve ark,1989) kullanılarak gerçekleştirildi. DNA ekstraksiyonu sonunda spektrofotometrede ölçüm yapıldı ve elde edilen nükleik asitler, moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR için primerlere ait bağlanma ısıları dikkate alınarak reaksiyonlar uygulandı. Master Mix karışımı ve PCR döngüleri aşağıda tanımlanmıştır.

Aşağıdaki koşullar altında 30 µl'lik bir reaksiyon hacminde PCR ürünleri amplifiye edilmiştir:

Taq DNA Polymerase	- 0,25 µl
10X Buffer	- 3 µl
25 mM MgCl ₂	- 2,4 µl
10 mM dNTP Miks	- 0,5 µl
Forward Primer	- 0,5 µl
Reverse Primer	- 0,5 µl
DW	- 19,85 µl
DNA ekstraktı	- 3 µl

Annealing ısıları (X), ORFV011 ve ORFV059 için 48 ila 60°C arasında değişen, ORFV020 için 56°C, ORFV127 için 58°C olarak kullanılmış olup, Şekil 2.1'deki reaksiyon koşulları uygulanmıştır:

Reaksiyon aşamaları	°C	Zaman (dakika)
Denatürasyon	96	6
Anneling	X	1
Extention	72	2
Denatürasyon	94	1
Final Extention	50	1
	72	10

34 siklus

Şekil 2.1. Reaksiyon Koşulları

Pozitif ampikonlar ticari kit yardımıyla pürifiye edilmiştir. Sekans analizi, hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. Elde edilen sekanslar, GenBank veri tabanından alınan aynı gen bölgelerine yönelik sekans dizinleri ile BioEDIT programında karşılaştırılıp hizalanmıştır (Hall, 1999). MEGA programı ile elde edilen verilerin filogenetik analizi yapılmıştır (Kumar ve ark, 2016).

2.2.3. PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezi

PCR sonucunda elde edilen ampikonları görüntülemek için, içinde GelRed® (Biotium, ABD) bulunan %1,5' luk agaroz jel hazırlandı. Agaroze jelin hazırlanmasında ve tank tamponunda TAE (Tris Asetate-Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA)) solüsyonu kullanıldı. Migro dalga fırın ile ısıtılan solüsyon içinde çözünen agaroz, soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 0,5 µg/ml oranında GelRed eklenerek ve karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım, jel tarakları yerleştirilmiş olan

jel küvetine dökülerek 20 dakika beklendi. Katılaşıp jel, elektroforez tankına yerleştirildi.

PCR sonrası elde edilen ürünler yükleme boyası (6X Loading Dye, Thermo Scientific, Lithuania) ile karıştırılarak jel içine yerleştirildi. Ürün büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenebilmesi için de 100 bp'lik merdiven (Thermo Scientific, Lithuania) solüsyonu en dışta bulunan kuyucuklara 1µl olacak şekilde koyuldu. Ürünler yaklaşık 20 dakika, 16 Volt/cm elektrik akımına tabi tutulduktan sonra jel görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 1500) kullanılarak PCR sonucu oluşan amplikonlar UV ışık altında görüntülendi.

2.2.4. Jel Ekstraksiyon Protokolü

Çift bant görülmesi durumunda jelde görüntülenen spesifik bant, steril bisturi yardımıyla %1'lik agaroz jelden kesilerek darası alınan eppendorf tüplere konuldu. Ağırlıkları ölçülen bantların ağırlığının 3 katı miktarda "Buffer QG" solüsyon konuldu. 50 °C' de 10 dk bekletilip eppendorf tüpteki jelin tamamen erimesi sağlandı. Numuneye 1 jel volumünde izopropanol eklenip karıştırıldı. Yıkama için 750 µl Buffer PE kolona eklenip vakumlandı. Kolon temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 14.000xg (13000 rpm) devirde 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınıp membran merkezine 50 µl Buffer PE eklendi ve 14.000xg (13000 rpm) devirde 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen amplikonlar kontrol amacıyla tekrar agaroz jelde yürütüldü, uygun olanlar sekans analizine kadar -20 °C' de saklandı.

2.2.5. Clean-up Protokolü

Filtreler kapakları gevşek şekilde oda ısısında binding buffer konularak 12500 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süzülen kısım atıldı. Steril eppendorf tüplere alınan filtrelere, PCR ürünü ilave edilerek 12500 rpm devirde 3 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemini takiben, elution buffer ilave edildi. Elde edilen pürifiye ampliconlar, kontrol amacıyla tekrar agaroz jelde yürütüldü, uygun olanlar eppendorf tüp içinde sekans analizine kadar -20 °C’de saklandı.

2.2.6. Dizin Analizi

Hizmet alımı yoluyla dizin analizi yapılmış olup, Çizelge 2.3’de gösterilen reaksiyon karışımı ve ısı döngülerinde gerçekleştirildi. Sanger metoduna göre yapılan dizin analizi için ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystem, ABD) cihazı kullanıldı.

Çizelge 2.3. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı ve Isı Döngüsü.

DNA Dizi Analizi Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Forward (µl)	Reverse (µl)
BigDye™ Terminator 3.1	4	
Ready Reaction Mix		
BigDye™ Terminator v1.1& v3.1 5X Sequencing Buffer	2	
Forward Primer (3.2 µM)	2	-
Reverse Primer (3.2 µM)	-	2
Deiyonize su (RNase/DNase free)	2	2
DNA	2	2
Toplam	12	12

Program ve Döngü Sayısı

96 °C→ 1 dk	
96 °C→ 10 sn	} 25 siklus
50 °C→ 5 sn	
60 °C→ 4 dk	
4 °C→ Hold	

2.2.7. Moleküler *in silico* analiz, Karakterizasyon ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

Analiz sonrası elde edilen dizinler National Center for Biotechnology Information (NCBI)' in veri tabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programına (Camacho ve ark., 2009) yüklendi. Dizin analizi konfirmasyonu sağlandıktan sonra moleküler karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi.

Sekans analizleri sırasında histogramları kontrol etmek amacıyla Moleküler Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 (MEGA v.7) (Kumar ve ark., 2016) programının “Tracer” bölümü kullanıldı. Aynı gen bölgesine ait dizilerin çoklu hizalaması “Clustal W Aligment” kullanılarak yapıldı. Hizalama sonrası dizinler 5' ve 3' uçlarından kesilerek uzunluk eşitlemeleri yapıldı. Nükleotid bazlı değişiklikler izlenerek karşılaştırma yapıldı.

Tam genom analizi yapılan örneklerin sekansları ile NCBI'ın altında yer alan GenBank veri tabanından referans dizinler ve diğer ülke suşları alındı. BioEdit programında Clustal W yöntemi ile hizalama işlemi yapılarak filogenetik aşamasına analize geçildi. Kromotogram oluşturmak için “Finch Tv” programından yararlanıldı. Modelleme sonrası Maksimum Likelihood (ML) ağacı oluşturmak için programda Maximum Likelihood istatistiksel metodu, Kimura-2 parametre modeli, 1000 bootstrap tekrarı seçildi. İşlem sonunda filogenetik ağaç elde edildi ve ağaç üzerinde tiplendirme yapıldı. Dört farklı gene ait sekans verileri kullanılarak, BioEdit programında PPV örneklerinin amino asit dizinleri oluşturuldu (Hall, 1999).

3. BULGULAR

3.1. Virolojik Kontrol Sonuçları

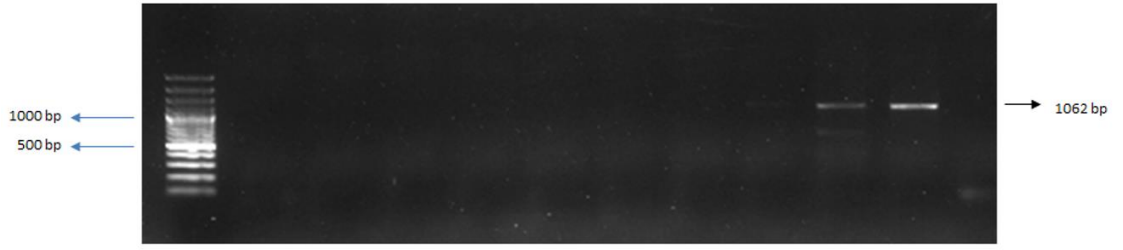
3.1.1. Viral Nükleik Asit İzolasyon Sonuçları

Dokuz adet PPV arşiv materyali ve 1 adet referenz virustan (D-1701), DNA ekstraksiyonu ile nükleik asit eldesi gerçekleştirilmiş olup, DNA miktarları PicoDrop™ spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen ürünlerdeki nükleik asit miktarları Çizelge 3.1’de gösterildi.

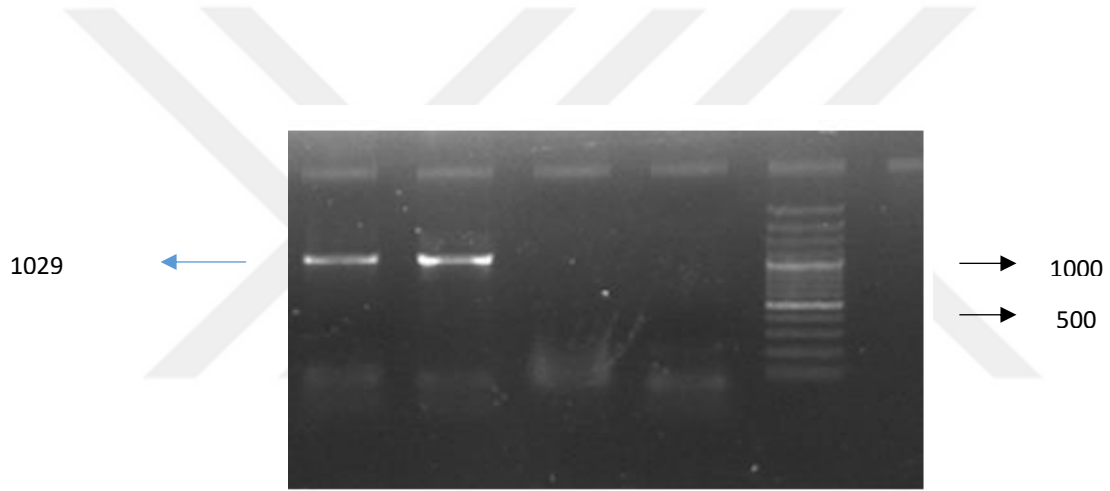
Çizelge 3.1. Saha örnekleri ve virus izolatlarına ait viral nükleik asit miktarı (ng/uL)

	Örnek İsmi	Viral Nükleik Asit Miktarı
1	TR-ORF-İzolat-2003	33,5
2	TR-ORF-2007	183,2
3	TR-ORF-İzolat-2019.1	37,4
4	TR-ORF-2019.2	69,2
5	TR-ORF-2020.1	132,4
6	TR-ORF-2020.2	245,1
7	TR-ORF-2020.3	167,2
8	TR-ORF-2021.1	228,5
9	TR-ORF-2021.2	151,3
10	D1701-RV	62,8

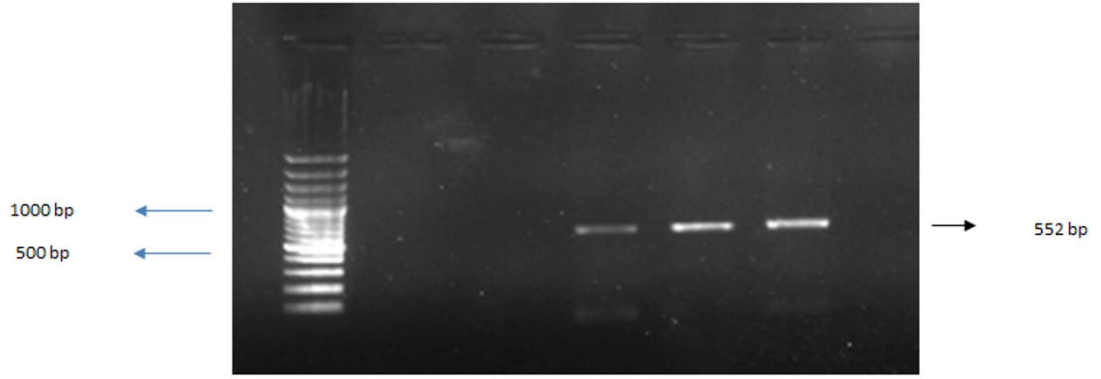
Referenz virus D-1701, pozitif kontrol olarak PCR optimizasyonları için kullanıldı. B2L gen bölgesine ait 1067 bp’lik, F1L gen bölgesine ait 1029 bp’lik, VIR gen bölgesine ait 552 bp’lik ve VIL gen bölgesine ait 480 bp’lik ampliconlar %1’lik agaroz jelde görüntülendi. Şekil 3.1, 3.2., 3.3 ve 3.4’te ilgili gen bölgeleri ve test edilen örneklere ait agaroz jel görüntüleri verilmiştir.



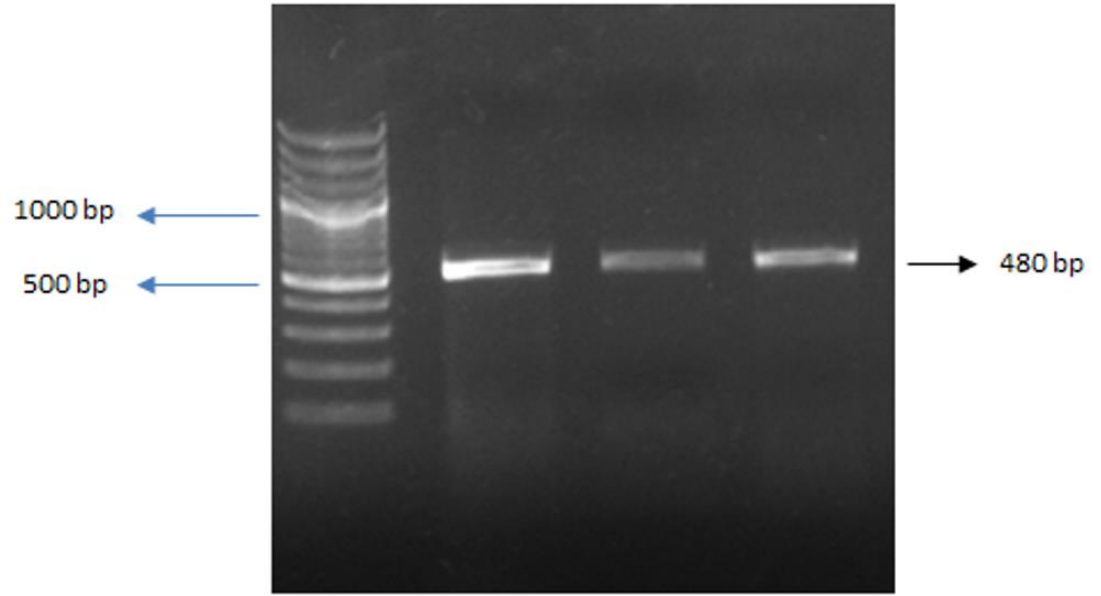
Şekil 3.1. B2L gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.2. F1L gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.3. VIR gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü



Şekil 3.4. VIL gen bölgesi primerleri ile PCR sonucu jel elektroforez görüntüsü

Dört farklı gen bölgesine ait primerler kullanılarak araştırılan tüm örneklerde (n=10) PPV nükleik asiti tespit edilmiştir.

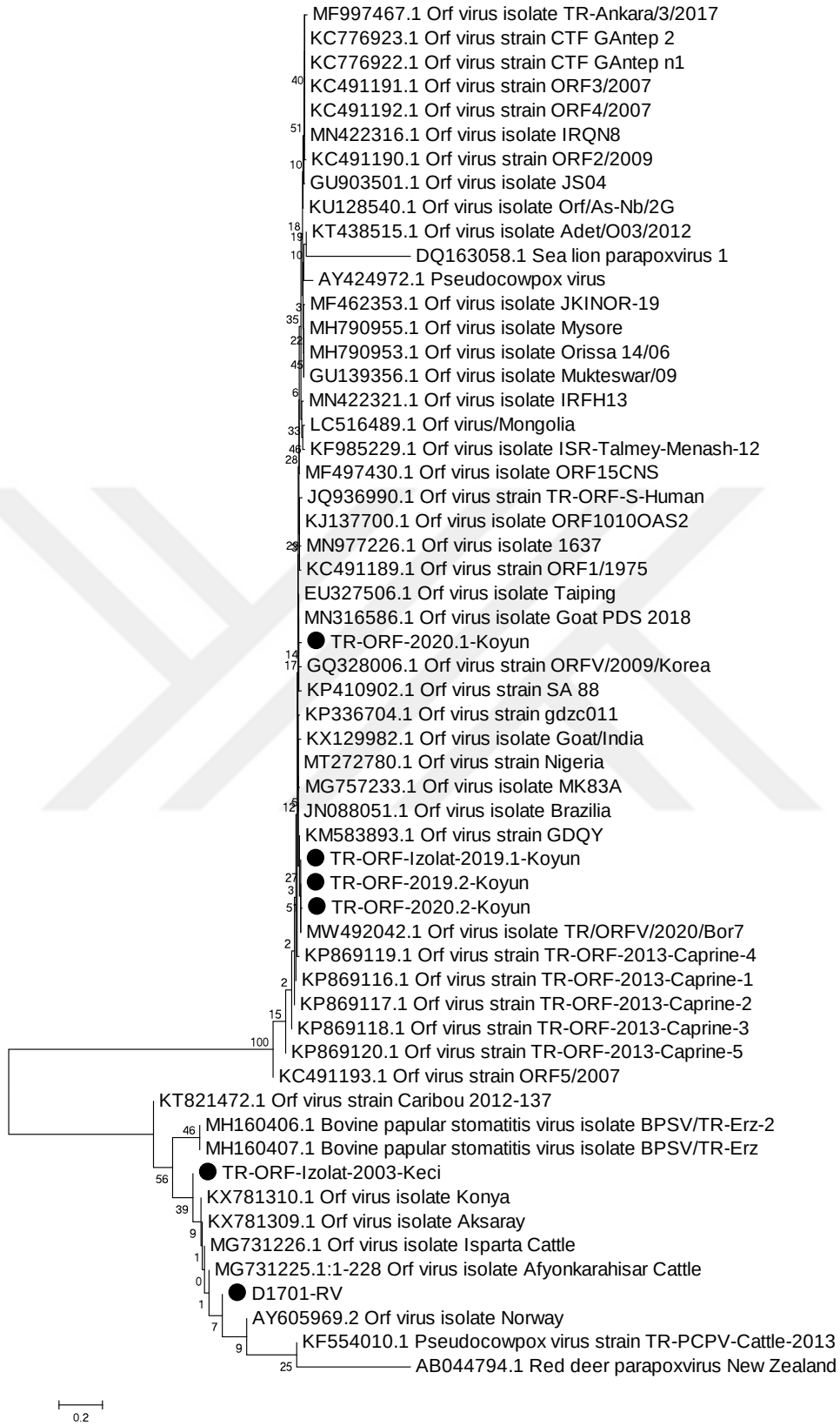
Çalışmada kullanılan tüm örneklerin dört gen bölgesine yönelik ampikon pozitiflikleri, baz uzunlukları ve GenBank accession numaraları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Örneklere ait ampikon pozitiflikleri, baz uzunlukları ve GenBank Accession numaraları

Örnek Adı	B2L 1062 bp	F1L 1029 bp	VIR 552 bp	VIL 480 bp
TR-ORF-İzolot-2003	OQ455247	OQ455254	OQ455271	OQ455261
TR-ORF-2007	OQ455252	OQ455256	OQ455276	OQ455266
TR-ORF-İzolot-2019.1	OQ455248	-	OQ455272	OQ455262
TR-ORF-2019.2	OQ455249	OQ455255	OQ455273	OQ455263
TR-ORF-2020.1	OQ455250	-	OQ455267	OQ455258
TR-ORF-2020.2	OQ455251	-	OQ455268	OQ455259
TR-ORF-2020.3	-	-	OQ455269	OQ455260
TR-ORF-2021.1	-	-	OQ455274	OQ455264
TR-ORF-2021.2	-	-	OQ455275	OQ455265
D1701-RV	OQ455253	OQ455257	OQ455270	-

3.1.2. Dizin Analizi ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Konvansiyonel PCR’da pozitif olarak belirlenen örneklere ait ampikonlar dizin analizine alındı. Çalışmada; B2L gen bölgesi yönünden 7 örnek, F1L gen bölgesi yönünden 4 örnek, VIR gen bölgesi yönünden 10 örnek ve VIL gen bölgesi yönünden 9 örnekten pozitiflik elde edilmiştir. Tüm pozitiflik saptanan örneklerden elde edilen dizinler, GenBank’tan alınan diğer PPV dizinleri ile karşılaştırıldı. Dört gen bölgesine ait filogenetik analizler yapılarak, ağaçlar çizildi. Aşağıda ilgili gen bölgeleri yönünden yapılan ağaçlar sunulmuştur (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8). Filogenetik ağaçlarda kullanılan referanslara ait bilgiler, çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4, Çizelge 3.5).

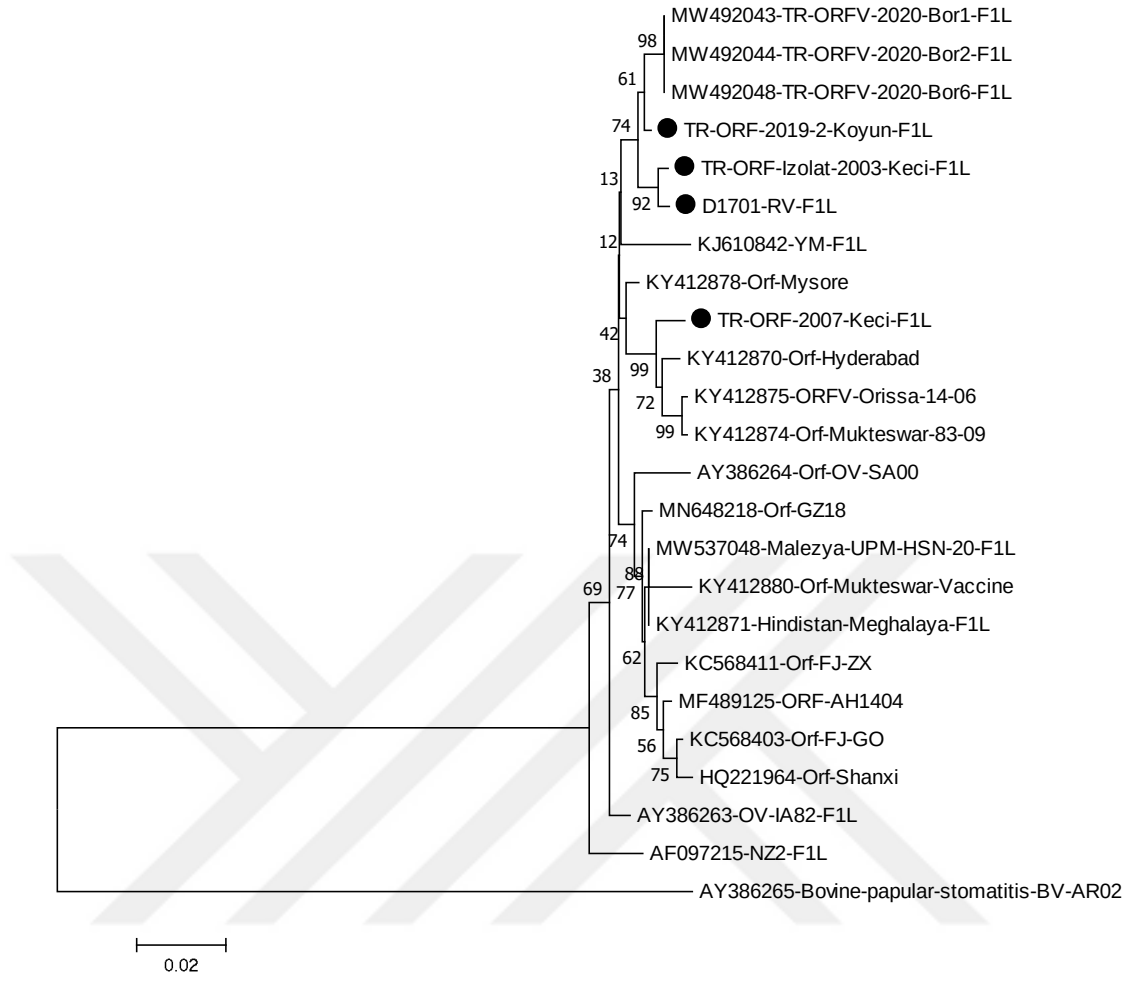


Şekil 3.5. B2L geni yönünden filogenetik ağaç

Çizelge 3.3. B2L gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri.

Accession no.	Tür	Konakçı	Coğrafi orijin	Kaynak
MF997467	ORFV	İnsan	Türkiye	Bayrakdar ve ark., 2018
KC776922 KC776923	ORFV	İnsan	Türkiye	Midilli ve ark., 2013
KC491189 KC491190	ORFV	Koyun	Türkiye	Hasöksüz ve ark., 2013 (yy)
KC491191 KC491192 C491193	ORFV	Keçi	Türkiye	Hasöksüz ve ark., 2013 (yy)
MN422316	ORFV	Keçi	İran	Nazeri ve ark., 2019 (yy)
MN422321	ORFV	Koyun	İran	Nazeri ve ark., 2019 (yy)
GU903501	ORFV	Koyun	Çin	Liu ve ark., 2007
KU128540	ORFV	Keçi	Hindistan	Venkatesan ve ark., 2016 (yy)
KT438515	ORFV	Koyun	Etiyopya	Gelaye ve ark., 2016
DQ163058	Sealpox virus	Deniz aslanı	ABD	Nollens ve ark., 2006
AY424972	PCPV	-	-	Guo ve ark., 2004
MF462353	ORFV	Koyun	Hindistan	Nazir ve ark., 2018 (yy)
MH790953	ORFV	Keçi	Hindistan	Yogisharadya ve ark., 2019
MH790955	ORFV	Koyun	Hindistan	Yogisharadya ve ark., 2019
GU139356	ORFV	Koyun	Hindistan	Venkatesan ve ark., 2010
LC516489	ORFV	Keçi	Moğolistan	Ogawa ve ark., 2019 (yy)
KF985229	ORFV	Koyun	İsrail	Bouznach ve ark., 2013
MF497430 KJ137700	ORFV	Koyun	Meksika	Velazques-Salinas ve ark., 2018
JQ936990	ORFV	İnsan	Türkiye	Karakaş ve ark., 2012
MN977226	ORFV	Keçi	İtalya	Gallina ve ark., 2020
EU327506	ORFV	Keçi	Tayvan	Chan ve ark., 2009
MN316586	ORFV	Keçi	Kanada	Dalton, 2020 (yy)
GQ328006	ORFV	Keçi	Güney Kore	Oem ve ark., 2009
KP410902	ORFV	Keçi	Küba	Scagliarini ve ark., 2012
KP336704	ORFV	Keçi	Çin	Zhang ve ark., 2015
KX129982	ORFV	Keçi	Hindistan	Shivasharanappa ve ark., 2015 (yy)
MT272780	ORFV	Keçi	Nijerya	Lawal ve ark., 2020 (yy)
MG757233	ORFV	-	Nijerya	Adedeji ve ark., 2019 (yy)
JN088051	ORFV	Keçi	Brezilya	Abrahao ve ark., 2011 (yy)
KM583893	ORFV	Keçi	Çin	Duan ve ark., 2015
MW492042	ORFV	Koyun	Türkiye	Koç ve Pekmez, 2021 (yy)
KP869116 KP869117 KP869118 KP869119 KP869120	ORFV	Keçi	Türkiye	Akkutay-Yoldar ve ark., 2016
KT821472	ORFV	Ren geyiği	Norveç	Klein ve Tryland, 2016
MH160406 MH160407	BPSV	Sığır	Türkiye	Timurkan ve ark, 2021
KX781309 KX781310	ORFV	Keçi	Türkiye	Şevik, 2017
MG731225 MG731226	ORFV	Sığır	Türkiye	Şevik, 2019
AY605969	ORFV	Ren geyiği	Norveç	Klein ve Tryland, 2005
KF554010	PCPV	Sığır	Türkiye	Oğuzoğlu ve ark., 2014
AB044794	RDPV	Geyik	Yeni Zelanda	Inoshima ve ark., 2001

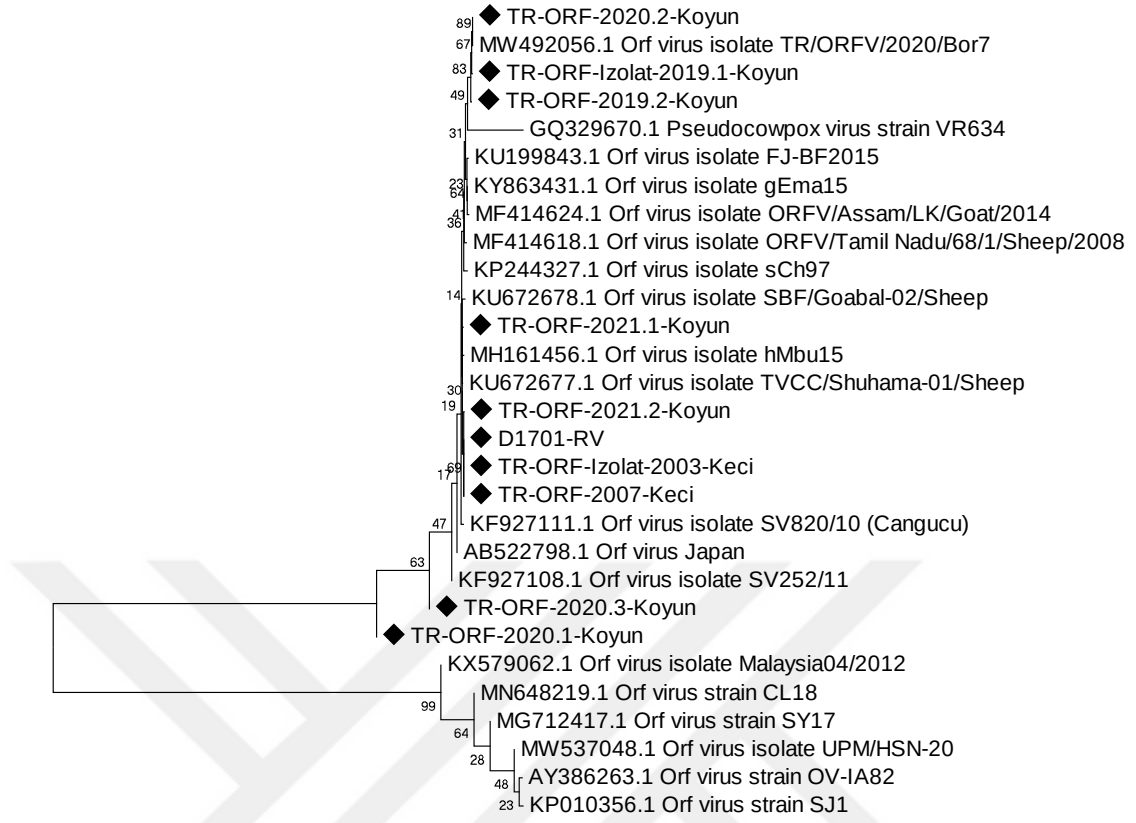
*(yayımlanmamış)- yy



Şekil 3.6. F1L geni yönünden filogenetik ağaç

Çizelge 3.4. F1L gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri.

Accession no.	Tür	Konakçı	Coğrafi orijin	Kaynak
MW492043 MW492044 MW492048	ORFV	Koyun	Türkiye	Koç ve Pekmez, 2021 (yy)
KY412870 KY412871 KY412874 KY412875 KY412878 KY412880	ORFV	Keçi Keçi Koyun Keçi Koyun Keçi	Hindistan	Yogisharadhya ve ark., 2018
AY386263 AY386264 AY386265	ORFV ORFV BPSV	Koyun Keçi Sığır	ABD	Delhon ve ark., 2004
MW537048	ORFV	Keçi	Malezya	Mangga ve ark., 2022
MF489125	ORFV	Keçi	Çin	Wang ve ark., 2018 (yy)
KC568403 KC568411	ORFV	Keçi Keçi	Çin	Chi ve ark., 2013
KJ610842	ORFV	Keçi	Çin	Sheer, 2014 (yy)
MN648218	ORFV	Keçi	Çin	Zhou ve ark, 2019
HQ221964	ORFV	Keçi	Çin	Shi, 2011 (yy)
AF097215	ORFV	Koyun	Yeni Zelanda	Housawi ve ark., 1998

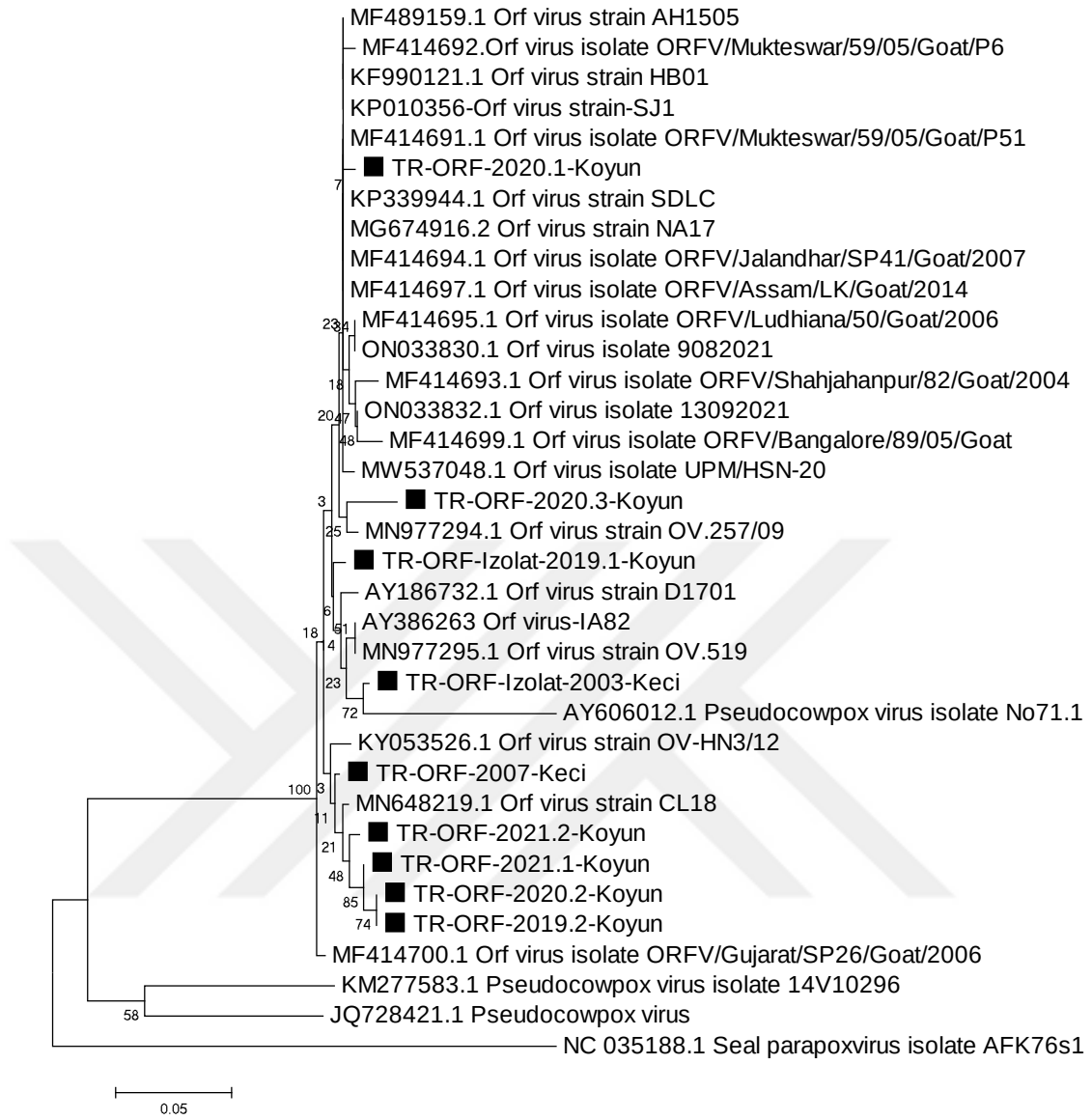


Şekil 3.7. VIR geni yönünden filogenetik ağaç

Çizelge 3.5. VIR gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri.

Accession no.	Tür	Konakçı	Coğrafi orijin	Kaynak
MW492056	ORFV	Koyun	Türkiye	Koç ve Pekmez, 2021 (yy)
GQ329670	PCPV	Ren geyiği	Yeni Zelanda	Hautaniemi ve ark., 2010
KU199843	ORFV	Keçi	Çin	Lin ve ark., 2016 (yy)
KY863431	ORFV	Keçi	Arjantin	Peralta ve ark., 2018 (yy)
MF414618 MF414624	ORFV	Keçi	Hindistan	Karki ve ark., 2018 (yy)
KP244327	ORFV	Koyun	Arjantin	Peralta ve ark., 2015
KU672677 KU672678	ORFV	Koyun	Hindistan	Ahanger ve ark., 2016 (yy)
MH161456	ORFV	İnsan	Arjantin	Peralta ve ark., 2019 (yy)
KF927108 KF927111	ORFV	Koyun	Brezilya	Martins ve ark., 2014
AB522798	ORFV	Serow*	Japonya	Inoshima ve ark., 2010
KX579062	ORFV	Keçi	Malezya	Bande ve ark., 2016 (yy)
MN648219	ORFV	Koyun	Çin	Zhou ve ark., 2021 (yy)
MG712417	ORFV	Koyun	Çin	Zhong ve ark., 2019 (yy)
MW537048	ORFV	Keçi	Malezya	Mangga ve ark., 2022
AY386263	ORFV	Koyun	ABD	Delhon ve ark., 2004
KP010356	ORFV	Keçi	Çin	Chi ve ark. 2015

*Güneydoğu Asya, Tayvan ve Japonya'nın ormanlık dağ yamaçlarına özgü, kısa ve keskin boynuzları olan keçi benzeri bir antilop türü.

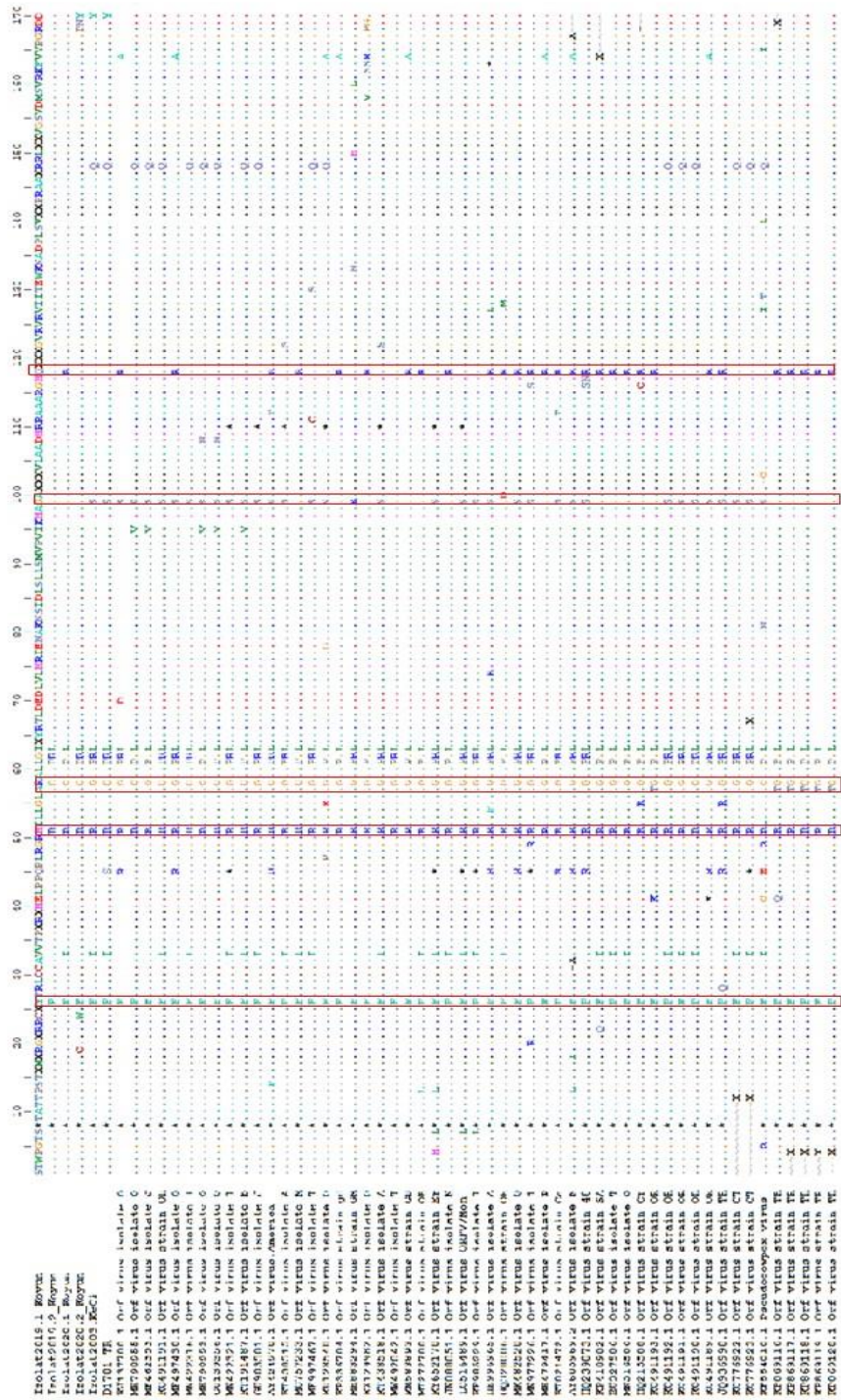


Şekil 3.8. VIL geni yönünden filogenetik ağaç

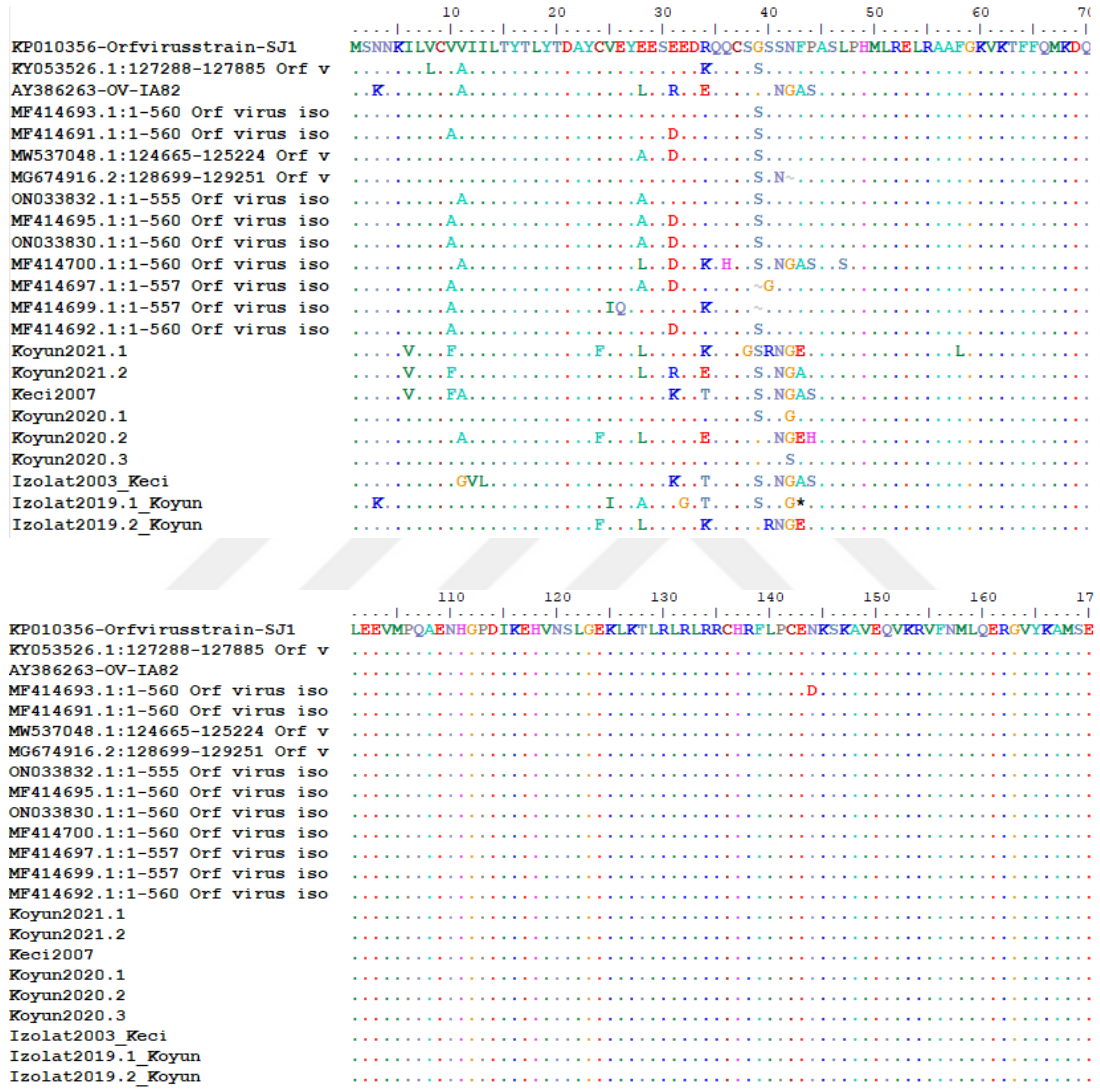
Çizelge 3.6. VIL gen bölgesinin filogenetik analizinde kullanılan referans dizilerin accession numaraları, etken türleri, ait olduğu coğrafi orijin ve verilerin elde edildiği kaynak bilgileri.

Accession no.	Tür	Konakçı	Coğrafi orijin	Kaynak
MF489159	ORFV	Keçi	Çin	Wang ve ark., 2018 (yayımlanmamış)
MF414691 MF414692 MF414693 MF414694 MF414695 MF414697 MF414699 MF414700	ORFV	Keçi	Hindistan	Karki ve ark., 2018 (yy)
KF990121	ORFV	Keçi	Çin	Sheer, 2014 (yy)
KP010356	ORFV	Keçi	Çin	Chi ve ark., 2015
KP339944	ORFV	Keçi	Çin	Zhang ve ark., 2015
MG674916	ORFV	Keçi	Çin	Huang ve ark., 2018 (yy)
ON033830 ON033832	ORFV	Keçi	Hindistan	Gupta ve ark., 2022 (yy)
MW537048	ORFV	Keçi	Malezya	Mangga ve ark., 2022
MN977294 MN977295	ORFV	Keçi	İtalya	Gallina ve ark., 2020
AY186732	ORFV	Koyun	Almanya	Rziha ve ark., 2003
AY386263	ORFV	Koyun	ABD	Delhon ve ark., 2004
AY606012	PCPV	Ren geyiği	Norveç	Klein ve Tryland, 2005
KY053526	ORFV	Koyun	Çin	Huiqin ve ark., 2018 (yy)
MN648219	ORFV	Koyun	Çin	Zhou ve ark., 2021 (yy)
KM277583	PCPV	Sığır	ABD	Jin ve ark., 2004 (yy)
JQ728421	PCPV	Deve	Hindistan	Nagarajan ve ark., 2014
NC_035188	Sealpox virus	Fok	Almanya	Günther ve ark., 2017

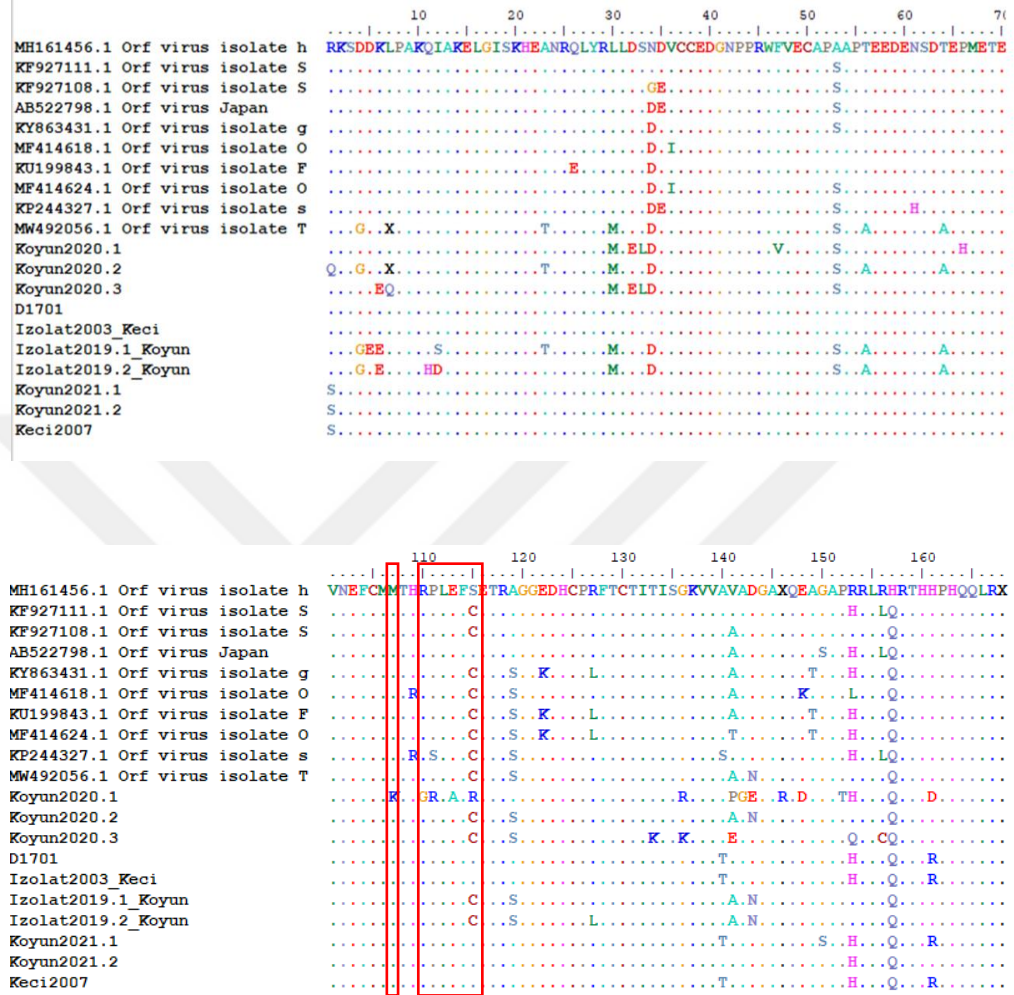
Bu çalışmada kullanılan saha örneklerinin Dünya'daki hem cinsleri ile dört farklı gen bölgesi amino asit (aa) karşılaştırmasında, VIL geni yönünden büyük oranda homoloji gösterdiği, B2L, F1L ve VIR gen bölgeleri yönünden heterojenik olduğu tespit edilmiştir. İlgili gen bölgeleri yönünden yapılan aa benzerlik ve farklılıklarını gösteren şekiller aşağıda sunulmuştur (Şekil 3.9; 3.10; 3.11; 3.12).



Şekil 3.9. B2L gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu



Şekil 3.11. VIL gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu



Şekil 3.12. VIR gen bölgesi aa farklılık/benzerlik durumu

4. TARTIŞMA

Ecthyma contagiosum (ORF), ruminantları etkileyen, oldukça bulaşıcı, kontrolsüz hayvan hareketleri ve mera kontaminasyonu nedeniyle periyodik olarak hafif ila orta şiddette salgınlara neden olan, kendini sınırlamasından dolayı çoğu zaman klinik ciddi bir hastalık tablosuna yol açmasa da, özellikle hastalığın yayıldığı endemik bölgelerde genç hayvanlarda ölümler ve deri sanayii açısından ekonomik etkileri önemli olabilen, zoonotik viral bir enfeksiyon olarak tanınmaktadır (Karakaş ve ark., 2013; McKeever ve ark., 1988 ve Midilli ve ark., 2013). Ülkemizde özellikle Kurban Bayramları vesilesi ile ruminantların hayvan pazarlarına sevki sürecinde, doğudan batıya doğru hayvan hareketlerinin artması ve kesim esnasında ve/veya karkasın işlenmesi sırasında enfekte dokularla doğrudan temas ile derideki port-antrelerden insanlara da bulaşması, bu enfeksiyonun “Tek Sağlık” konseptinde de yerini almasına neden olmaktadır. Bu bağlamda, enfeksiyon zincirinin hayvanlarda kırılabilmesi adına etkin ve etkili aşılama çalışmalarının yürütülmesi için; enfeksiyona neden olan virusların moleküler karakterizasyonlarının yapılarak, sirküle olan suşların aşı suşları ile ne ölçüde örtüştüğü ya da ayrıştığının değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında, küçük ruminantlardan 2003 ila 2021 yılları arasında toplanan ORF pozitif arşiv materyalleri (n= 9 + 1 referenz virus) test edilmiş olup, Ülkemizde sirküle olan suşların moleküler yöntemler kullanılarak yaklaşık 20 yıllık süreçte geçmişten günümüze değerlendirilmesine olanak sağlanmıştır. Dünyanın farklı coğrafyalarındaki hem cinsleri ve kullanılan aşı suşları ile karşılaştırılması sayesinde de bu enfeksiyonla mücadeleye ışık tutucu bilgiler elde edilmiştir.

ORF tanısında, OIE manualinde önerilen “Gold” testlerden olan elektron mikroskopi sıklıkla kullanılmış olup (OIE, Terrestrial Manual, Chapter 3.8.12), günümüzde hızlı tanı, karakterizasyon ve klinik bulguların benzer olduğu diğer poxvirus enfeksiyonlarının ayrımını yapabilmek amacıyla moleküler teknikler tercih edilir olmuştur (Tedla ve ark., 2018; Velazquez-Salinas ve ark., 2018 ve Venkatesan ve ark., 2018). Elektron mikroskopi ile tanıda gerekli olan deri döküntüleri, aft ve

kabuk materyali yanı sıra, ORF virus generalizasyonu sonrası malignant/visceral/iç organ formunun gelişimi olan hayvanlarda organ materyalinin de PCR da kullanılabilirliği, moleküler tekniklerin daha sıklıkla kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu tez kapsamında, arşiv materyali olarak derin dondurucuda muhafaza edilen saha örneği kabuk materyalleri (n= 6), virus izolasyon çalışması sonucu elde edilen hücre kültürü süpernatantları (n=3) ve 1 adet akciğer dokusu kullanılmıştır. Araştırmaya alınan tüm materyaller, PCR ile pozitif bulunmuştur. Bu bağlamda, “Gold” testler dışında PCR temelli testlerin, PPV enfeksiyonunun hızlı tanısında, incelenen örnek türü yönünden de avantajlar sunduğu sonucuna varılmıştır.

ORF enfeksiyonunun tarihsel geçmişine bakıldığında, koyun ve keçilerin konakçı olduğu kabul edilen bir PPV enfeksiyonu olmakla birlikte (Fleming ve ark., 2015; Nandi ve ark., 2011), moleküler tekniklerin kullanıldığı yakın tarihteki çalışmalarla sığırların da konakçı spektrumunda yer alabileceği kanıtlanmıştır (Şevik, 2019). Bu tez çalışmasında, sadece küçük ruminantlardan elde edilen Parapoxvirus pozitif örnekler kullanılmış olup, Ülkemizde ORFV’larının sığırları da enfekte edebileceğine dair moleküler kanıtlar, 2019 yılında yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Şevik, 2019). Bu tez çalışmasında kullanılan koyun (n=7) ve keçilere (n=2) ait örneklerin, araştırılan gen bölgeleri yönünden filogenetik analizlerinde, birbirlerinden farklı kümelenmedikleri tespit edilmiştir. Bu bağlamda, PPV’ların tür bazında genetik çeşitliliği için bir değerlendirme yapmak mümkün olmamakla birlikte, türler arası geçiş yeteneğinin daha fazla anlaşılabilmesi için, farklı türlere (sığır/koyun/keçi/vb.) ait PPV örneklerinin konak aralığını belirleyen viral gen bölgeleri (ORF008, vb.) açısından değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Geçmişte Poxvirusların sınıflandırılmasında; morfolojik yapı, nükleik asit tipi, replikasyon şekli, enfekte ettikleri konakçı ve neden oldukları hastalıklar gibi fenotipik özelliklere ek olarak (Fenner ve ark., 1988; Fleming ve ark., 2007 ve Parrish ve Moss, 2007), serumların çapraz nötralizasyon reaktivitesi ve türler arasındaki çapraz korumaya dayalı testler kullanılmış olmakla birlikte, günümüzde dizin analizi bu tekniklerin önüne geçmiştir (Venkatesan ve ark., 2018).

Poxviruslar, yapılarında 130 ila 200 gen içeren, linear özellikte çift iplikli nükleik asit barındıran en büyük DNA viruslarıdır. Bu genlerin en az yarısı, konak aralığının belirlenmesinde, virulans ve immun modülasyonda görevlidir. Bu tez çalışmasında kullanılan arşiv materyalleri, *Poxviridae* ailesinin *Chordopoxvirinae* alt ailesinin *Parapoxvirus* genusunda yer alan etkenlerin dört farklı gen bölgesi yönünden araştırılmıştır. Seçilen bu gen bölgeleri; immunojenik yanıtta (ORFV011/B2L ve ORFV059/F1L), hücrel interferon aktivitesinin inhibisyonunda (ORFV020/VIR) ve virulens ile immun sistemden kaçışta görevli (ORFV127/vIL-10) viral proteinlerdir (Fleming ve ark., 1997; Hosamani ve ark., 2006 ve Velazquez-Salinas ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı, Ülkemizde sirkülasyonda olan PPV'ların yaklaşık 20 yıllık filodinamiğini incelemek olup, araştırılan dört gen bölgesi yönünden saha örneklerinin filogenetik analizinde, Çin, Hindistan, Brezilya ve Uzak Doğu ülkelerindeki viruslarla yüksek homoloji tespit edilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, dört gen bölgesine yönelik bulgular ayrı ayrı tartışılacaktır.

PPV'ların major envelope proteini olan B2L, konakçı aralığının belirlenmesinde önem taşımaktadır (Hosamani ve ark., 2006). Bu tez çalışması kapsamında B2L gen bölgesi yönünden yapılan filogenetik analiz sonuçlarına göre, son yıllara ait örneklerin Ülkemizden bildirimi yapılan ORF virus sekansları ile homoloji gösterdiği, GenBank veri tabanından edinilen 1975 yılı ila 2020 yıllarına ait Türkiye orijinli suşlarla filogenetik ağaçta yakın lokalize oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8). Dünyadaki B2L sekansları ile yapılan karşılaştırmada ise, bu tez kapsamında karakterize edilen son yıllara ait PPV suşlarının; İran, İsrail, Taiwan, Çin ve Nijerya PPV suşları ile de homolog oldukları tespit edilmiş olup, özellikle Hindistan, Kore, Kanada ve Brezilya suşları ile daha yakın genetik ilişkili oldukları belirlenmiştir.

Alpler'de yaşayan yabani ruminant türlerinin (Alageyik-*Cervus elaphus*, Chamoï-*Rupicapra rupicapra* ve Alp Dağ Keçisi-*Capra ibex*), *Papillomaviridae* ve *Poxviridae* ailelerine ait epiteliyotropik viruslar yönünden araştırıldığı bir çalışmada (Gallina ve ark., 2020), 2008'den 2018'e kadar toplanan örneklerde PPV varlığı tespit edilmiştir. Hatta bir Alageyik'in her iki enfeksiyöz ajanla ko-enfekte olduğu, ORF virus enfeksiyonuna yönelik klinik bulgu gösteren Alp Dağ Keçisi (n=2) ve Chamoï'nin (n=1) ise Bovine Papilloma Virus ile eş zamanlı enfekte oldukları belirlenmiştir. Poxviruslar ve Papillomaviruslar aynı anda sığır, kanatlı ve insan deri lezyonlarında da tespit edilmiş olup, araştırmacılar bu viruslar arasında olası bir avantajlı etkileşim olacağı kanaatine varmışlardır (Gallina ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında ORF virus pozitifliği belirlenen 2003 yılına ait keçi orijinli bir saha izolatu ve Viroloji Anabilim Dalı referenz virusu (D-1701), PPV B2L gen bölgesi yönünden hem Türkiye orijinli BPSV (sığır), PCPV (sığır), Avrupa orijinli (AY605969) ve hem de Parapoxvirus Red Deer New Zealand (PVNZ) ile yakın ilişkili bulunmuştur. Bu tez çalışmasında sadece küçük ruminant örneklerindeki ORFV'lar yönünden bir değerlendirme yapılmış olmakla birlikte, konakçı orijin dikkate alındığında küçük ruminant orijinli suşların, büyük ruminant orijinli sözü edilen bu suşlarla yakınlığı dikkat çekici bulunmuştur. Bu bağlamda, Gallina ve ark.'nın (2020) türe özgü olarak kabul edilen Papilloma virusların farklı hayvan türlerini çapraz enfekte etme kabiliyeti hakkındaki görüşünün, Parapoxviruslar için de uygun olabileceği, ayrıca epiteliotropik virusların epidemiyolojisi, doğal dinamikleri, ko-enfeksiyon ihtimali ve patogenetik rolü hakkında bilgi edinebilmek için farklı türlerden elde edilecek saha örneklerinin kullanıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

PVNZ'nin tonsillerde persiste kalabildiği virus izolasyonu yapılarak tespit edilmiş olup, asemptomatik olarak enfekte hayvanların bu virusu taşıyabildikleri ve duyarlı çiftlik hayvanlarına bulaşta önemli bir kaynak olabilecekleri bildirilmiştir (Friederichs ve ark., 2015). PVNZ, Alageyik'lerden izole edilmiş bir PPV'tur. Bu virusun neden olduğu zoonotik insan enfeksiyonu henüz kanıtlanmamış olsa da insanlara virus bulaşmasında, örneğin yaban hayattaki geyik karkaslarının avcılar için potansiyel bir risk olabileceği, Friederichs ve ark., (2014) tarafından ileri sürülen bir

hipotez olmakla birlikte, persiste kalabilen bu enfeksiyöz ajan için önemli bir tespit olarak değerlendirilmelidir. Bu tez kapsamında araştırılan ORFV'ların B2L sekansları, 2012 yılında Ülkemiz'den bildirilen bir insan PPV enfeksiyonu (JQ936990) (Karakaş ve ark., 2012) ile de yakınlık göstermekte olup, bu hipotezi destekler nitelik göstermektedir. Ayrıca yine Ülkemiz'den bildiri yapılan sığır orijinli PCPV suşu ile (KF554010), bu tez kapsamında kullanılan D-1701 referenz suşunun ve 1 adet 2003 yılına ait keçi orijinli PPV izolatının genetik yakınlığı da bu hipotezi destekleyen benzer bir diğer örnek olarak değerlendirilmiştir. Gerek yaban hayatta yaşayan ve gerekse çiftlikte yetiştirilen ruminantların ortak mera kullanımı sebebiyle temasta bulunabileceği gerçeğinden hareketle, çok bulaşıcı olan ORF virusunun çiftlik hayvanlarına ve bu enfekte hayvanlarla temas eden kişilere (bakıcı/yetiştirici/mezbaha personeli/Veteriner Hekim gibi) bulaşabileceği riskinin bulunduğu unutulmamalıdır. Konakçı-tür bariyerinin aşılmasına ilişkin sonuçların, zoonotik potansiyel yönünden de değerlendirilmesi gerektiği görüşüne varılmıştır.

B2L gen bölgesindeki bazı spesifik kalıntıların, bazı virus suşları açısından konakçı tercihinin belirlemede önemli olduğu bildirilmiştir (Velazquez-Salinas ve ark., 2018). Bu durum, korunmada kullanılan aşılardan açısından önemli olup, koyunlardan izole edilen bir suşla keçilerin aşılmasında sonucunda kullanılan keçi orijinli challenge virusa karşı korunmanın olmadığı rapor edilmiştir (de la Concha-Bermejillo ve ark., 1999). Bu nedenle kontrol programlarını etkileyebilecek sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Örneğin koyun orijinli D-1701 referenz virusu aynı zamanda bir aşı suşu olarak da kullanılmıştır (Reguzova ve ark., 2020). ORF enfeksiyonu hem Ülkemizde hem de Dünyada bildiri zorunlu bir hastalık olmadığı için, neden olduğu üretim kayıplarının yeterince önemsenmediğine inanılmaktadır (Spyrou ve Valiakos, 2015). Ülkemizdeki ORFV enfeksiyonlarından kazanılan saha örneklerinin Hindistan, Çin ve Uzak Doğu ülkelerindeki suşlarla yakın genetik ilişkisi olduğu B2L sekanslarının filogenetik analizinde görülmektedir. D-1701 referenz suşu ise filogenetik ağaçta 2003 yılındaki bir keçi izolatı ile birlikte, genellikle Avrupa ve Yeni Zelanda orijinli suşlara yakın olarak lokalize olmaktadır. Ayrıca, son yıllara ait saha örneklerinin B2L gen bölgesi dizinlerinin D-1701 gibi aşı suşlarından uzak olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde aşı suşu olarak kullanılan ORF virusu B2L gen bölgesi

dizini (KC491189) (Gülyaz, kişisel bilgi), sirküle olan güncel saha suşları ile karşılaştırıldığında TR-ORF-2020.1 isimli koyun suşu ile filogenetik olarak yakın bulunurken, diğer araştırılan tüm suşlarla filogenetik ağaçta daha uzak lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 3.5). 2020 yılında sahadaki enfeksiyonun aşı suşu kaynaklı olup olmadığı bilinmemekle birlikte, bu bulgu kullanımda olan mevcut aşının sahadaki enfeksiyonlara karşı koruyuculuğunun araştırılması gerektiği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu konuda, Ülkemiz'deki salgınlardan elde edilen kuzu ve oğlak orijinli ORFV izolatlarının B2L gen bölgesi yönünden moleküler karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada (Gulyaz ve ark., 2020), kuzu ve oğlaklardan izole edilen suşlar arasında B2L bölgesinde genomik farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca söz konusu çalışmada, kuzu orijinli ve halen kullanımda olan PenOrf aşısı ile aşılanan oğlakların, oğlak orijinli challenge ORF virusuna karşı yeterli düzeyde korunmadığı rapor edilmiştir. Kuzu orijinli mevcut aşı suşunun (PenOrf), B2L gen bölgesi yönünden keçi orijinli izolatlarla daha yakın olduğu ve genomik farklılıklar nedeniyle kuzuları ORF enfeksiyonuna karşı korumadığı, hem kuzu hem oğlak ORF viruslarını içeren bivalent aşıların hazırlanması ve kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Yapılan bu çalışma (Gulyaz ve ark., 2020) ile uyumlu olarak, bu tez çalışmasında kullanılan örneklerin B2L gen bölgesi dizinlerinin heterojenite gösterdiği görülmektedir. Her ne kadar ORF enfeksiyonunun mücadelesinde kullanılan aşı suşları için, konakçı özgüllüğü olmamakla birlikte, sirküle olan saha suşlarındaki mutasyonların, aşı başarısını negatif yönde etkilebileceği ihtimalinin göz ardı edilmemesi gerektiği unutulmamalıdır.

PPV'ların immundominant ve en yüksek antikor oluşumunu indükleyen viral proteini olan F1L, Ülkemizde küçük ruminant orijinli ORFV'ların değerlendirildiği bu tez çalışması kapsamında araştırılmış bir diğer önemli proteindir. ORFV genomunun yüksek oranda korunmuş bir parçası olan F1L geni (Housawi ve ark., 1998) tarafından kodlanan 39 kDa'luk baskın bir antijenik yapı olup (Haig ve Mercer, 1998; Haig ve ark., 1996), Vacciniavirus H3L geni için homologtur ve her iki virus birbirleriyle yapısal benzerlikler taşımaktadırlar (Housawi ve ark., 1998). Her iki gen de enfeksiyonda geç kopyalanır ve hücre içi olgun virion zarfında eksprese edilen immünojenik proteinleri kodlar. H3L immünodominant proteininin C-terminal ankraj

proteinlerinin (Da Fonseca ve ark., 2000a) bir üyesi olarak virus olgunlaşmasında (Da Fonseca ve ark., 2000b) ve memeli hücrelerine viral adsorpsiyonda görevlidir (Lin ve ark., 2000).

F1L gen bölgesi yönünden, TR-2003-Keçi ve D-1701 referenz suşu arasında yüksek homoloji bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak, TR-2003-Keçi suşunun F1L geni yönünden NZ2 suşu ile de aynı mutasyona sahip olması dikkat çekici bulunmuştur. ORFV enfeksiyonuna karşı Ülkemiz orijinli herhangi bir aşı virusuna ait F1L gen bölgesi GenBank verisi bulunamadığından, bu bölge yönünden bir karşılaştırma yapabilmek mümkün olamamıştır. Ancak, Türkiye orijinli 2020 yılına ait ORFV sekansları GenBank veri tabanında bulunduğundan, F1L gen bölgesi yönünden benzer amino asit farklılıklarının bu viruslarda da varlığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Bu bağlamda, sahada sirküle olan virusların F1L gen bölgesi dizinlerinin aşı suşları ile karşılaştırılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır. Aşı suşlarının immunojenisitenin değerlendirilebilmesi adına, bu araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir.

VIL geni yönünden filogenetik analizde, Türkiye orijinli 2003 keçi izolatu (Kırıkkale) genetik olarak PVNZ suşu ile daha yakınlık gösterirken, 2007 keçi suşu (Şanlı Urfa) son yıllara ait koyun ORFV suşları ile daha yakın ilişkili bulunmuştur. PPV suşlarının coğrafik orijinlerine ve elde edildiği yıllara göre bir değerlendirme yapıldığında, farklı genetik özellikteki suşların Ülkemizde sirkülasyonda olduğu tespit edilmiştir. Üstelik söz konusu her iki örnek keçi orijinli olduğundan, ortak mera kullanımı sebebiyle bu virusların yaban hayatta da bulunabileceği fikrine sahip olunmuştur.

PVNZ, ilk olarak 1986 yılında Yeni Zelanda'da görülmüştür (Horner ve ark., 1987). Alageyik'ler ilk kez, 1850'lerde Avrupa'dan Yeni Zelanda'ya getirilmiş olup, aslında Avrupa orijinli PVNZ etkeni ile Yeni Zelanda'nın ilk tanışmasının eski kıtasından nakille bu yıllarda olduğu tahmin edilmektedir (Robinson ve Mercer, 1995).

Ayrıca bu virusun, 2011 yılındaki İtalyan PPV suşlarının karakterize edildiği bir çalışma sonucunda Yeni Zelanda dışında Avrupa'da da varlığı belirlenmiştir (Scagliarini ve ark., 2011). Alageyik ve sığırları enfekte edebilen PPV'lar arasındaki genetik benzerlik göz önüne alındığında, bu hayvan türlerinin PCPV, BPSV ve PVNZ'ye duyarlılığını değerlendirmek için ekolojik çalışmalar tasarlanması gerekliliği de aynı çalışmada (Scagliarini ve ark., 2011) bildirilmiş olup; Ülkemiz'deki küçük ruminantlardan elde edilen bu suşların (2003 ve 2007 keçi ORFV'ları), PVNZ gibi büyük ruminantları enfekte eden suşlarla benzerliğinin antijenik açıdan ve virulens yönünden de değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Zira PVNZ, klinik açıdan da önemli ve Alageyik'lerde ölümlere yol açabilen bir virus olup, virulensi ve patojenitesi de farklılıklar gösterebilmektedir. Bu genetik yakınlığın Ülkemiz'deki suşlar açısından önemli olduğu kanaatine varılmış olup, sahada sirküle olan virusların virulensi ve patojenitesine ilişkin detaylı çalışmaların yapılması, aşı kullanımlı kontrol programlarının başarısı açısından önem arz etmektedir.

PPV'ların VIR geni viral interferon direnç geni olup; bu gene yönelik sekans analizi çalışmaları sayesinde virus suşlarının heterojenitesinin belirlenmesi, mutasyonların analizi ile suşların virulent veya non-virulent olarak sınıflandırılması ve genogrupların tayini mümkün olabilmektedir.

Koyun orijinli 2021.1 ve 2021.2 suşları, keçi orijinli 2003 ve 2007 ORFV'ları ve Koyun orijinli D-1701 referenz virusunun VIR geni filogenetik analizinde Çin, Arjantin ve Hindistan PPV'ları ile yakın genetik ilişkide bulundukları tespit edilmiştir. 2020 yılına ait koyun orijinli 2 adet suş ise Brezilya PPV suşları ile yakınlık göstermektedir. 2020 yılına ait 1 adet koyun suşu ve 2019 yılına ait 2 adet koyun suşunun, GQ329670 nolu PCPV ve Hindistan orijinli PPV'larla yakın ilişki içinde olduğu görülmüştür. Bu gen bölgesi yönünden yapılan filogenetik analiz sonuçları, Ülkemiz orijinli ORFV'larının heterojenitesini göstermekle birlikte, oluşan mutasyonların konakçı türü açısından herhangi bir farklılık göstermediği sonucuna varılmıştır. Bu genomik bölge yönünden daha önce yapılan bir çalışmada (Kottaridi ve ark., 2006), PPV izolatlarının konakçı türlerden, coğrafi kökenden ve izolasyon

zamanından bağımsız bir filogenetik gruptama modeli gösterdiği rapor edilmiş olup, bu tez çalışmasında VIR gen bölgesi yönünden elde edilen sonuçlar, literatürdeki bu bilgilerle paralellik göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, 2003 ve 2021 yılları arasında kazanılan Ecthyma contagiosum (ORFV) enfeksiyonu arşiv materyali kullanılmış olup, saha örnekleri ve 1 adet referenz suşun, immunojenik yanıt (ORFV011/B2L ve ORFV059/F1L), hücrel interferon aktivitesinin inhibisyonu (ORFV020/VIR) ve virulens ile immun sistemden kaçışta görevli (ORFV127/vIL-10) gen bölgeleri moleküler teknikler kullanılarak araştırılmıştır.

Aşağıda tez kapsamında elde edilen sonuç ve öneriler listelenmiştir:

✓ Bu çalışmada 9 adet ORFV pozitif arşiv materyali ve 1 adet referenz suş, retrospektif olarak moleküler teknikler kullanılarak karakterize edilmiş olup, tüm örnekler Parapoxvirus genusu içerisinde yer alan hem cinsleri ile filogenetik açıdan yakın ilişkili bulunmuştur.

✓ Parapoxvirusların tanısında “Gold” teknik olarak önerilen elektron mikroskopi ve virus izolasyon tekniklerinin, uzman personel/ekipman/zaman/tanı materyali konusundaki dezavantajlarına alternatif olarak PCR temelli tekniklerin kullanımı önerilmektedir. Ayrıca, moleküler tekniklerin epiteliotrop viral etkenler yönünden ayırıcı tanıdaki avantajı da göz ardı edilmemesi gereken bir diğer konu olarak değerlendirilmiştir.

✓ Yapılan filogenetik analizlerde, Ülkemizde sirküle olan ORFV suşlarının yıllara göre heterojenite gösterdiği, Dünyadaki hemcinsleri ile karşılaştırılmasında, özellikle Hindistan, Çin ve Brezilya başta olmak üzere çeşitli coğrafyalara ait PPV’larla yakın genetik ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

✓ Son yıllara ait saha örneklerinin, dünyada referenz virus ve aşı suşu olarak da kullanılan D-1701'den genetik olarak uzak olması dikkat çekici bulunmuştur.

✓ Bu çalışma kapsamında elde edilen dizinler GenBank veri tabanına girilerek accession numaraları (OQ455247-OQ455276) alınmıştır.

✓ GenBank veri tabanında Ülkemiz orijinli aşı suşu olduğu teyidi sözlü bilgi olarak yapılan bir izolata ait sadece B2L sekansı (KC491189) bulunduğundan, bu çalışmada PPV genomuna ait B2L dışında diğer üç bölge yönünden de karakterize edilen suşların detaylı karşılaştırma imkânı bulunamamıştır. Bu bağlamda, kullanımda olan aşı suşlarının özellikle B2L gen bölgesi yanısıra F1L gen bölgesi yönünden de genetik analizlerinin yapılması ve dizinlerin GenBank veri tabanına eklenmesi önerilmektedir.

✓ Mücadele kullanılan aşılarda etkinliği açısından değerlendirmeler yapabilmek için, sirküle olan virusların periyodik olarak kontrolünün önemli olduğu bilinmektedir. Bu gerekçeyle PPV'ların biyoçeşitliliğini değerlendirmek amacıyla immün yanıttan sorumlu major envelope proteini başta olmak üzere, konakçı bağışık yanıtını baskılayarak immün sistemden kaçmasını sağlayan viral gen bölgelerinin de karakterizasyonu önerilmektedir.

✓ Her ne kadar PPV'ların tanısında B2L gen bölgesine yönelik pan genetik primerler ile parsiyel bir ampikon kazanımı mümkün olsa da, saha örneklerindeki mutasyonların tüm B2L geni dizinlerine erişilmesini kısıtlayabileceği kanaatine varılmıştır. Bu çalışmada sahadan elde edilen suşların karakterizasyonunda, özellikle PPV'ların VIR ve VIL gen bölgelerine yönelik primerler ile %100 pozitif ampikon eldesi mümkün olmuştur. Bu bağlamda, ileride yapılacak çalışmalarda bu iki gen bölgesinin tanı amaçlı da kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi önerimizdir.

✓ Küçük ruminantlarda bulunan PPV enfeksiyonlarının büyük ruminantlardaki türlerle genetik olarak yakın ilişkili olduğu tespit edilmiş olup, PPV'larının konakçı-tür bariyerini aşabilme etkinliklerinin, zoonotik potansiyel yönünden de değerlendirilmesi gerektiği görüşüne varılmıştır.

ÖZET

Ruminant Parapox Virus Arşiv Materyallerinde ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L), ORFV020 (VIR), ORFV127 (vIL-10) Genlerinin Moleküler Tekniklerle Araştırılması

Poxviridae ailesinin *Parapoxvirus* genusunda yer alan ve ruminantları enfekte eden viral etkenler, aynı zamanda zoonotik öneme sahiptirler. Parapoxvirus genusu üyeleri; koyun ve keçiler başta olmak üzere, sığır ve diğer ruminant türlerinde de enfeksiyon meydana getirmeleri yanı sıra, çiftçiler, hayvan bakıcıları, veteriner hekimler gibi hayvanlarla çalışan insanlar için de risk oluşturmaktadır.

Bu yüksek lisans tezinde, arşiv materyallerinde *Poxviridae* ailesinin *Parapoxvirus* genusunda bulunan viral etkenlerin, nükleik asit temelli PCR tekniği kullanılarak araştırılması hedeflenmiş olup, bu amaçla Parapoxvirusların 4 adet gen bölgesine (ORFV011-B2L, ORFV059-F1L, ORFV020-VIR ve ORFV127-vIL-10) spesifik primerler kullanılarak arşiv materyalleri (n=10) PCR ile araştırılmıştır. Tüm pozitif örnekler ilgili gen bölgelerine yönelik olarak dizin analizine tabi tutulmuştur.

Yapılan filogenetik analizler ile GenBank veri tabanında bulunan hem cinsleri ile yakınlık ve uzaklıkları belirlenmiştir. Bu retrospektif çalışma sayesinde 2003 ila 2021 yılları arasında sirküle olan saha viruslarının değişimleri araştırılmıştır. Bu tez çıktılarının, Türkiye’de sirküle olan saha viruslarının yaklaşık 20 yıllık geçmişine ışık tutucu verilerinin; parapoxvirusların mücadelesinde kullanılabilecek programlara hizmet edeceği kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Parapoxvirus, ruminant, saha suşları, moleküler karakterizasyon, Türkiye

SUMMARY

Investigation of ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L), ORFV020 (VIR), ORFV127 (vIL-10) Genes in Ruminant Parapox Virus Archival Materials by Molecular Techniques

Viral agents, which are in the Parapoxvirus genus of the Poxviridae family and infect ruminants, also have zoonotic importance. Members of the Parapoxvirus genus; In addition to causing infection in cattle and other ruminant species, especially sheep and goats, it also poses a risk for people working with animals such as farmers, animal keepers and veterinarians.

In this master's thesis, it was aimed to investigate the viral agents in the Parapoxvirus genus of the Poxviridae family in archival materials using nucleic acid-based PCR technique, and for this purpose, archival materials (n=10) were searched by PCR using specific primers for 4 gene regions of Parapoxviruses (ORFV011-B2L, ORFV059-F1L, ORFV020-VIR and ORFV127-vIL-10). All positive samples were subjected to sequence analysis for the related gene regions.

With the phylogenetic analyzes, the affinities and distances of the genus in the GenBank database were determined. Through this retrospective study, changes in circulating field viruses between 2003 and 2021 were investigated. The outputs of this thesis are illuminating data on the nearly 20-year history of field viruses circulating in Turkey; We believe that it will serve the programs that can be used in the fight against parapoxviruses.

Keywords: Parapoxvirus, ruminant, field strains, molecular characterization, Türkiye

KAYNAKLAR

- ABU ELZEİN EM, HOUSAWİ FM (1997). Severe long-lasting contagious ecthyma infection in a goat's kid. *Zentralbl Veterinarmed B* **44**: 561–564.
- ACHEN MG, JELTSCH M, KUKK E, MAKİNEN T, VİTALİ A, WİLKS AF, ALİTALO K, AND STACKER SA (1998). Vascular endothelial growthfactor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(2),548–553.
- AFONSO CL, DELHON G, TULMAN ER, LU Z, ZSAK A, BECERRA VM, ZSAK L, KUTISH GF, ROCK DL (2005). Genome of deerpox virus. *J Virol* **79**: 966–977.
- AKKUTAY-YOLDAR Z, OGUZOGLU TC, AKÇA Y (2016). Diagnosis and phylogenetic analysis of orf virus in Aleppo and Saanen goats from an outbreak in Turkey. *Virol Sin.* **31**(3):270-273.
- ALCAMİ A, SYMONS JA, COLLİNS PD, WİLLİAMS TJ AND SMİTH GL (1998). Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *J. Immunol.* **160**(2), 624–633.
- ALENA REGUZOVA, MİCHAEL GHOSH, MELANİE MÜLLER, HANNS-JOACHİM RZİHA, RALF AMANN (2020). Orf Virus-Based Vaccine Vector D1701-V Induces Strong CD8+ T Cell Response against the Transgene but Not against ORFV-Derived Epitopes. *Vaccines* **295**; doi:10.3390/vaccines8020295.
- ANDERSON PM (1997). Delivery Systems for Immunomodulatory Proteins and Peptides. *BioDrugs*, **7**, 51–65.
- ANDREWES C, PEREİR A (1964). *Viruses of vertebrates*. Baillière, Tindall, Cassell, London.
- AYNAUD M (1923). La stomatite pustuleuse contagieuse des ovins (chancre du mouton. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **36**: 498–527.
- AZWAİ SM, CARTER SD, WOLDEHİWET Z (1995). Immune responses of the camel (*Camelus dromedarius*) to contagious ecthyma (Orf) virus infection. *Vet Microbiol* **47**: 119–131.
- BALAMURUGAN, V., KRİSHNAMOORTHY, P., RAJU, D. S., RAJAK, K. K., BHANUPRAKASH, V., PANDEY, A. B., GAJENDRAGAD, M. R., PRABHUDAS, K. AND RAHMAN, H. (2014). Prevalence of Peste-des-petits-ruminant virus antibodies in cattle, buffaloes, sheep and goats in India. *Virus Disease*, **25**, 85-90.
- BARRY, P.A. (2015) Exploiting viral natural history for vaccine development. *Med. Microbiol. Immunol.* **204**, 255–262.
- BHANUPRAKASH, V.; HOSAMANİ, M.; VENKATESAN, G.; BALAMURUGAN, V.; YOGİSHARADHYA, R.; SİNGH, R.K. (2012) Animal poxvirus vaccines: A comprehensive review. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 1355–1374.

- BLOOD DC, RADOSTITS OM, HENDERSON JA, ARUNDEL JH, GAY CC (1983). Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats and horses. Bailliere Tindall, London, 945–946.
- BLOOMQUIST LUKE, MD; CHIEF EDITOR: MICHAEL STUART BRONZE, MD (2018). Parapoxviruses Clinical Presentation Updated: Apr 16, 2018.
- BONNEVIE P (1937). Milker's warts: infection from "false cowpox" with a paravaccinia virus. *Br J Dermatol* **49**: 165; cited in: M Binns, GL Smith (eds): Recombinant poxviruses. CRC Press, Boca Raton.
- BOUGHTON I, HARDY W (1935). Immunization of Sheep and Goats against Sore Mouth (Contagious Ecthyma). *Tex. FARMER Collect.* **504**, 16.
- BOUZNACH A, HAHN S, STRAM Y, MENASHEROV S, EDERY N, SHICHAHT N, KENIGSWALD G, PERL S (2013). Case report: Contagious Ecthyma – Deviations in the Anatomical Appearance of Lesions in an Outbreak in Lambs in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* **68**: 246-251.
- BRUN, A.; BARCENA, J.; BLANCO, E.; BORREGO, B.; DORY, D.; ESCRIBANO, J.M.; LE GALL-RECULE, G.; ORTEGO, J.; DIXON, L.K. (2011) Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res.* **157**, 1–12.
- BUDDLE, B.; PULFORD, H. (1984) Effect of passively-acquired antibodies and vaccination on the immune response to contagious ecthyma virus. *Vet. Microbiol.* **9**, 515–552.
- BUKAR AM, ABDULLAH JESSE FF, ABDULLAH CAC, NOORDIN MM, LAWAN Z, MANGGA HK, BALAKRISHNAN KN, MOHD AZMI ML (2021). Immunomodulatory Strategies for Parapoxvirus: Current Status and Future Approaches for the Development of Vaccines against Orf Virus Infection, *Vaccines* (Basel), **9**, 11: 1341.
- BULLER R, MARK L (2017). Infectious Diseases || Poxviruses. 1452–1457.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00170-2.
- BURGU I, TOKER A (1984). Bir kuzunun dış etinden Ecthyma contagiosum (ORF) virusu izolasyonu. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **31**, 2: 230-239
- BUTTNER M, RZİHA HJ (2002). Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**: 7–16.
- BUTTNER M, VON EINEM C, MCINNES C, OKSANEN A (1995). Clinical findings and diagnosis of a severe parapoxvirus epidemic in Finnish reindeer. *Tierarztl Prax* **23**: 614–618.
- CARSON CA, KERR KM (1967). Bovine papular stomatitis with apparent transmission to man. *J Am Vet Med Assoc* **151**:183–187.
- CHAN KW, YANG CH, LIN JW, WANG HC, LIN FY, KUO ST, WONG ML, HSU WL (2009). Phylogenetic analysis of parapoxviruses and the C-terminal heterogeneity of viral ATPase proteins. *Gene.* **432**(1-2):44-53.
- CHEN, S.; MIAO, B.; CHEN, N.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; DU, Q.; HUANG, Y.; TONG, D. (2020) A novel porcine parvovirus DNA-launched infectious clone carrying stable double labels as an effective genetic platform. *Vet. Microbiol.* **240**, 108502.

- CHENG HY, LÍ WJ, LÍ XM, FAN QL, TANG XD, LÍU MJ, MA WT, CHEN DK (2018). Pathogenicity of blood orf virus isolates in the development of dairy goat contagious pustular dermatitis. *Vet Microbiol*, **219**: 178-182.
- CHÍ X, ZENG X, HAO W, LÍ M, LÍ W, HUANG X, WANG S, LUOLÍ S (2015). Genome analysis of orf virus isolates from goats in the Fujian Province of southern China. *Front Microbiol*. **6**:1135.
- CHRISTOPHER J.BURRELL COLÍN R.HOWARDFREDERICK A.MURPHY, (2016). Fenner and White's medical virology Chapter 16 – Poxviruses.
- CHUNG, E.L.T.; ABDULLAH, F.F.J.; IBRAHÍM, H.H.; MARZA, A.D.; ZAMRÍ-SAAD, M.; HARON, A.W.; LÍLA, M.A.M.; NORSÍDÍN, M.J. (2016) Clinico-pathology, hematology and biochemistry responses in buffaloes towards *Pasteurella multocida* type B: 2 immunogen lypopolysaccharide via oral and intravenous routes of infection. *Microb. Pathog.* **91**, 141–154.
- CLARK, C., MCINTYRE, P. G., EVANS, A., MCINNES, C. J. & LEWIS-JONES, S. (2005) Human sealpox resulting from a seal bite: confirmation that sealpox virus is zoonotic. *Br J Dermatol* **152**, 791–793, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06451.x.
- CZERNY CP, WALDMANN R, SCHEUBECK T (1997) Identification of three distinct antigenic sites in parapoxviruses. *Arch Virol* **142**:807-821.
- DA FONSECA FG, WOLFFE EJ, WEISBERG A, MOSS B (2000a). Characterisation of the vaccinia H3L protein: Topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J Virol* **74(16)**: 7508–7517.
- DAMON, I., 2007. Poxviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 2947–2976.
- DAS A, WARD G, LOWE A, XU L, MORAN K, RENSHAW R, DUBOVI E, REISING M, JIA W (2017). Development and validation of a highly sensitive real-time PCR assay for rapid detection of parapoxviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **29(4)**:499-507. doi:10.1177/1040638716680676.
- DASHTSEREN T, SOLOVYEV BV, VAREJKA F, KHOKHOO A (1984). Camel contagious ecthyma (Pustular Dermatitis). *Acta Virol* **28**:128–133.
- DEANE D, MCINNES CJ, PERCIVAL A, WOOD A, THOMSON J, LEAR A, HAIG D (2000). Orf Virus Encodes a Novel Secreted Protein Inhibitor of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-2. *J Virol* **74**:1313–20.
- DEGÍVE A (1884). Une affection-type ou maladie inédite – la stomatite papillaire 154 Stephen B. Fleming and Andrew A. Mercer ou papillomateuse – observée sur quatre génésis. *Ann Med Vet* 33: 369; cited in: M Binns, GL Smith (eds): Recombinant poxviruses. *CRC Press*, Boca Raton.
- DELANY, I.; RAPPUOLÍ, R.; DE GREGORÍO, E. (2014) Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol. Med.* **6**, 708–720
- DELHON G, TULMAN ER, AFONSO CL, LU Z, CONCHA-BERMEJILLO A DE LA, LEHMKUHL H D, PICCONE M E, KUTISH G F, ROCK D L (2004). Genomes

- of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *J Virol.* **78**(1):168-177.
- DOWNIE AW, DUMBELL KR (1956). Poxviruses. *Annu Rev Microbiol* 10: 237–252.
- DUAN C, LIAO M, WANG H, LUO X, SHAO J, XU Y, LI W, HAO W, LUO S (2015). Identification, phylogenetic evolutionary analysis of GDQY orf virus isolated from Qingyuan City, Guangdong Province, southern China. *Gene.* **555**(2):260-268.
- ERGİN H, KÖKLÜ A (1973). Ektima virusunun doku kültürlerinde pasajı ve antijenik özelliklerinin incelenmesi. *Pendik Vet. Bakt. Serol. Ensl. Derg*, **6**, (2): 12-20.
- FAUQUET CM, MAYO, MA, MANİLOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA (EDS) (2005). Virus Taxonomy. Eighth report of the International committee on Taxonomy of viruses. *Academic Press, Elsevier, London*, 117–133.
- FENNER F (1976). Classification and nomenclature of viruses. *Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology* **7**: 1–115.
- FIELD, ANNE M (1982). [Advances in Virus Research] Volume 27 || Diagnostic Virology Using Electron Microscopic Techniques. 1–69. doi:10.1016/s0065-3527(08)60432-7.
- FLEMING, S. B., MCCAUGHAN, C. A., ANDREWS, A. E., NASH, A. D., & MERCER, A. A. (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology*, **71**(6), 4857-4861.
- FLEMING, S. B., & MERCER, A. A. (2007). Genus Parapoxvirus. In A. A. Mercer, A. Schmidt, & O. Weber (Eds.), *Poxviruses* (pp. 127-165). Basel: Birkhäuser Basel
- FLEMING SB, WISE LM AND MERCER AA (2015). Molecular genetic analysis of orf virus: A poxvirus that has adapted to skin. *Viruses*, **7**(3): 1505-1539.
- FLEMING, S. B., MCCAUGHAN, C., LATEEF, Z., DUNN, A., WISE, L. M., REAL, N. C., & MERCER, A. A. (2017). Deletion of the Chemokine Binding Protein Gene from the Parapoxvirus Orf Virus Reduces Virulence and Pathogenesis in Sheep. *Front Microbiol*, **8**, 46.
- FRİEBE, A.; SİEGLİNG, A.; FRİEDERİCHS, S.; VOLK, H.-D.; WEBER, O. (2004) Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-Like Cells. *J. Virol.* **78**, 9400–9411.
- FRİEDERİCHS S, KREBS S, BLUM H, WOLF E, LANG H, VON BUTTLAR H, BÜTTNER M (2014). Comparative and retrospective molecular analysis of Parapoxvirus (PPV) isolates.
- FÖRSTER, R.; WOLF, G.; MAYR, A. (1994) Highly attenuated poxviruses induce functional priming of neutrophils in vitro. *Arch. Virol.* **136**, 219–226.
- GALLİNA L, DAL POZZO F, INNES C J MC, CARDETİ G, GUERCİO A, BATTILANİ M, CIULLI S, SCAGLIARİNİ A (2006). A real-time PCR assay for the detection and quantification of orf virus. *J Virol Methods* **134**: 140–145.

- GALLINA L, SAVINI F, CASÀ G, BERTOLETTI I, BIANCHI A, GIBELLI L R, LELLI D, LAVAZZA A, SCAGLIARINI A., (2020). Epitheliotropic Infections in Wildlife Ruminants From the Central Alps and Stelvio National Park. *Front Vet Sci.* **7**:229.
- GELAYE E, ACHENBACH JE, JENBERIE S, AYELET G, BELAY A, YAMI M, LOITSCH A, GRABHERR R, DIALLO A, LAMIN E C (2016). Molecular characterization of orf virus from sheep and goats in Ethiopia, 2008-2013. *Virology* **13**:34.
- GITAO CG (1994). Outbreaks of contagious ecthyma in camels (*Camelus dromedarius*) in the Turkana district of Kenya. *Rev Sci Tech* **13**: 939–945.
- GREIG A, LINKLATER KA, CLARK WA (1984). Persistent orf in a ram. *Vet Rec* **115**: 149.
- GRIESEMER RA, COLE CR (1960). Bovine papular stomatitis. I. Recognition in the United States. *J Am Vet Med Assoc* **137**: 404–410.
- GRIESEMER RA, COLE CR (1961). Bovine papular stomatitis. II. The experimentally produced disease. *Am J Vet Res* **22**: 473–481.
- GUOHONG ALBERT WU, SE-RAN JUN, GREGORY E. SIMS, AND SUNG-HOU KIM (2009) Whole-proteome phylogeny of large dsDNA virus families by an alignment-free method. doi.org/10.1073/pnas.0905115106
- GUO J, ZHANG Z, EDWARDS JF, ERMEL RW, TAYLOR C, de la CONCHA-BERMEJILLO A (2003). Characterization of a North American orf virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis. *Virus Res.* **93**, 169–179.
- GUO J, RASMUSSEN J, WÜNSCHMANN A, DE LA CONCHA-BERMEJILLO A. (2004). Genetic characterization of orf viruses isolated from various ruminant species of a zoo. *Vet Microbiol.* **99**(2):81-92.
- GULYAZ V, HASOKSUZ M, BULUT M, SARAÇ F (2020). Molecular characterization of contagious ecthyma virus (CEV) isolated from goat and cross-protection studies. *Med. Weter.* **76**: 331-336.
- GÜNEŞ AT, GEZEN C, KAPDAĞLI H, MARCHALL HJ (1982). Ecthyma-contagiosum-Epidemien in der Türkei. *Der Hautarzt*, **33**: 384-387.
- GÜNTHER T, HAAS L, ALAWI M, WOHLSEIN P, MARKS J, GRUNDHOFF A, BECHER P, FISCHER N. (2017). Recovery of the first full-length genome sequence of a parapoxvirus directly from a clinical sample. *Sci Rep. Jun* **16**;7(1):3734.
- HAIG DM, MCINNES CJ, DEANE D, LEAR A, MYATT N, REID HW, ROTHEN J, SEOW HF, WOOD P, LYTTLE D, MERCER AA (1996). Cytokines and their inhibitors in orf virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* **54**: 261–267.
- HAIG DM, MERCER AA. (1998) Ovine diseases. *Orf Vet Res.* **29**(3–4):311–326.
- HAIG, D.M., FLEMING, S. (1999) Immunomodulation by virulence proteins of the parapoxvirus 19 orf virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**, 81–86. doi:10.1016/S0165-2427(99)00119-
- HAIG, DAVID M, THOMSON, J., MCINNES, C.J., DEANE, D.L., ANDERSON, I.E., MCCAUGHAN, C.A., IMLACH, W., MERCER, A.A., HOWARD, C.J., FLEMING, S.B. (2002). A comparison of the anti31 inflammatory and immuno-stimulatory

- activities of orf virus and ovine interleukin-10. *Virus Res.* **90**, 303–316. doi:10.1016/S0168-1702(02)00252-6
- HALL TA (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- HANİ H, İBRAHİM TAT, OTHMAN AM, LİLA MAM, ALLAUDİN ZNB (2010). Isolation, density purification, and in vitro culture maintenance of functional caprine islets of Langerhans as an alternative islet source for diabetes study. *Xenotransplantation* 2010, 17, 469–480.
- HANSEN (1879). *Tidsskr Vet* **9**: 298; cited in: Hodgson-Jones IS (1951) Orf in London. *Br Med J* **1**: 795.
- HARTUNG J (1980). Contagious ecthyma of sheep (cases in man, dog, alpaca and camel). *Tieraerztl Prax* **8**: 435–438.
- HASHEMİNASAB SS, MAHMOODİ A, MAHMOODİ P, MAGHSOOD H (2016) Orf virus infection in human ecthyma contagiosum: a report of two cases in the West of Iran. *Virusdisease* **27**(2):209–210
- HAUTANIEMİ M, UEDA N, TUIMALA J, MERCER AA, LAHDENPERÄ J, MCINNES CJ. (2010). The genome of pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain. *J Gen Virol.* **91**(Pt 6):1560-1576.
- HEİDARİEH, H.; HERNÁEZ, B.; ALCAMÍ, A. (2015) Immune modulation by virus-encoded secreted chemokine binding proteins. *Virus Res.* **209**, 67–75
- HİCKS BD, WORTHY GA (1987). Sealpox in captive grey seals (*Halichoerus grypus*) and their handlers. *J Wildl Dis.* **23**(1):1-6.
- HORNER GW, ROBINSON AJ, HUNTER R, COX BT, SMİTH R (1987). Parapoxvirus infections in New Zealand farmed red deer (*Cervus elaphus*). *NZ Vet J.* **35**:41–5. DOI: 10.1080/00480169.1987.35376.
- HOSAMANİ, M., BHANUPRAKASH, V., SCAGLIARİNİ, A. AND SİNGH, R.K. (2006) Comparative sequence analysis of major envelope protein gene (B2L) of Indian orf viruses isolated from sheep and goats. *Vet. Microbiol.* **116**(4), 317-324.
- HOSAMANİ M, SCAGLIARİNİ A, BHANUPRAKASH V, MCINNES CJ, SİNGH RK. (2009) Orf: an 414 update on current research and future perspectives. *Expert Rev Anti Infect* 415 Ther [Internet]. **1**;7(7):879–93.
- HOUSAWİ FMT, ROBERTS GM, GİLRAY JA, POW I, REİD HW, NETTLETON PF, SUMPTION KJ, HİBMA MH, MERCERAA (1998). The reactivity of monoclonal antibodies against orf virus with other parapoxviruses and the identification of a 39 kDa immunodominant protein. *Arch Virol* **143**: 2289–2303.
- HOUSAWİ, F.M.; ABUELZEİN, E.M.; GAMEE, A.A.; ALAFALEQ, A.I. (2012) Comparative study on three locally developed live orf virus vaccines for sheep in Saudi Arabia. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **79**, 5.

- HU, M.-M.; SHU, H.-B. (2020) Innate Immune Response to Cytoplasmic DNA: Mechanisms and Diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 79–98.
- JANEWAY, C.A., JR.; MEDZHİTOV, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216.
- INOSHİMA Y, MOROOKA A, SENTSUİ H (2000). Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **84**:201–208.
- INOSHİMA Y, ITO M, ISHİGURO N. (2010). Spatial and temporal genetic homogeneity of orf viruses infecting Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Vet Med Sci.* **72**(6):701-707.
- INOSHİMA Y, MURAKAMİ K, YOKOYAMA T, SENTSUİ H (2001). Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*). *J Gen Virol.* **82**(Pt 5):1215-1220.
- JACOBSON R. (1996). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 3rd ed. Paris, France: OIE, 8–15.
- JEZEK Z, KRİZ B, ROTHBAUER V. (1983). Camelpox and its risk to the human population. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **27**: 29–42.
- JOHN D.S, University Of Connecticut School Of Medicine; Professor Of Preventive medicine, Stony Brook Medical Center (2019). Erişim: <https://emedicine.medscape.com/article/226239-overview>, 18.09.2022.
- JOHNSTON, J.B.; MCFADDEN, G. (2003) Minireview Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. *J. Virol.* **77**, 6093–6100.
- KARAKAS A, OGUZOGLU TC, COSKUN O, ARTUK C, MERT G, GUL HC, SENER K, ÖZKUL A (2013). First molecular characterization of a Turkish orf virus strain from a human based on a partial B2L sequence. *Arch Virol.* **158**(5):1105-1108.
- KİTCHEN, M., MÜLLER, H., ZOBL, A., WİNDİSCH, A., ROMANİ, N., & HUEMER, H. (2013). Orf Virus Infection in a Hunter in Western Austria, Presumably Transmitted by Game. *Acta Dermato-Venereologica*, **94**(2), 212–214.
- KLEİN J, TRYLAND M., (2005). Characterisation of parapoxviruses isolated from Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Virol J* **2**: 79.
- KOTTARİDİ C, NOMİKOU K, LELLİ R, MARKOULATOS P, MANGANA O., (2006). Laboratory diagnosis of contagious ecthyma: comparison of different PCR protocols with virus isolation in cell culture. *J Virol Methods* **134**:119–124.
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. (2016)MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics 458 Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 459 **33**(7):1870–4.
- LATEEF, Z.; BAİRD, M.A.; WİSE, L.M.; YOUNG, S.; MERCER, A.; FLEMİNG, S.B. (2010) The chemokine-binding protein encoded by the poxvirus orf virus inhibits recruitment of dendritic cells to sites of skin inflammation and migration to peripheral lymph nodes. *Cell Microbiol.* **12**, 665–676.

- LACASTA D, REINA R, DE ARCAUTE MR, FERRER LM, BENITO AA, TEJEDOR MT, ECHEVERRÍA I, RUZÍ H, CARDENAS SM, WINDSOR PA (2021). Effect of a topical formulation on infective viral load in lambs naturally infected with orf virus. *VMRR* **12**:149-58.
- LÍ Y, CARROLL DS, GARDNER SN, WALSH MC, VITALIS EA, DAMON IK (2007). On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**:15787–15792.
- LÍN C, CHUNG C, HEINE HG, CHANG W., (2000). Vaccinia virus envelope H3L proteins binds to cell heparan sulfate is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J Virol* **74**(7): 3353–3365.
- LIPSCHUTZ B (1932). Paravaccine, Julius Springer, Berlin; cited in: M Binns, GL Smith (eds): Recombinant poxviruses. CRC Press, Boca Raton.
- LIU Y, SHAO H, CHENG R (2007). Establish and application of PCR detection method to contagious pustular dermatitis virus. *Jilin Xu Mu Shou Yi*. **03**:7–9.
- LLOYD JB (1996). A study of the immune response of sheep to orf virus. Ph.D thesis, Department of Veterinary Pathology, University of Sydney, Sydney.
- LOH, H.-S.; MOHD-LILA, M.-A.; ABDUL-RAHMAN, S.-O.; KIEW, L.-J. (2006) Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Viol. J.*, **3**, 42.
- MAHY BWJ, VAN REGENMORTEL MHV (2008) (Eds.) Encyclopedia of Virology, 3rd ed. Elsevier Ltd., Oxford, UK, pp. 157–162.
- MANGGA HK, BALA JA, BALAKRISHNAN KN, BUKAR AM, LAWAN Z, GAMBO A, JESSE FFA, NOORDIN MM, MOHD-AZMI ML (2022). Genome-Wide Analysis and Molecular Characterization of Orf Virus Strain UPM/HSN-20 Isolated From Goat in Malaysia. *Front Microbiol*. **13**:877149.
- MAOLLIN AS, ZESSIN KH (1988). Outbreak of camel contagious ecthyma in central Somalia. *Trop Anim Health Prod* **20**: 185.
- MARTINS M, CARGNELUTTI JF, WEIBLEN R, FLORES EF (2014). Pathogenesis in lambs and sequence analysis of putative virulence genes of Brazilian orf virus isolates. *Vet Microbiol*. **74**(1-2):69-77.
- MARTINS, M.; JOSHI, L.; RODRIGUES, F.D.S.; ANZILIERO, D.; FRANDOLOSO, R.; KUTISH, G.F.; ROCK, D.L.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F.; DIEL, D.G. (2017) Immunogenicity of ORFV-based vectors expressing the rabies virus glycoprotein in livestock species. *Virology* **511**, 229–239.
- MCINNES, C.J., WOOD, A.R., NETTLETON, P.E., GILRAY, J.A (2001). Genomic comparison of an avirulent strain of Orf virus with that of a virulent wild type isolate reveals that the Orf virus G2L gene is non-essential for replication. *Virus Genes* **22**, 141–150.
- MCKEEVER DJ (1984). Persistent orf. *Vet Rec* **115**: 334–335.

- MCLANE, L.M.; HAKEEM, M.A.; WHERRY, E.J. (2019) CD8 T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 457–495.
- MERCER, A.A., FRASER, K., BARNS, G., ROBINSON, A.J. (1987). The structure and cloning of orf virus DNA. *Virology* **157**, 1–12.
- MİDİLLİ K, ERKİLİÇ A, KUŞKUCU M, ANALAY H, ERKİLİÇ S, BENZONANA N, YİLDİRİM MS, MÜLAYİM K, ACAR H, ERGONUL O (2013). Nosocomial outbreak of disseminated orf infection in a burn unit, Gaziantep, Turkey. *Euro Surveill.* **18**(11):20425.
- MUNZ E, SCHILLINGER D, REIMANN M, MAHNEL H (1986). Electron microscopical diagnosis of Ecthyma contagiosum in camels (*Camelus dromedarius*). First report of the disease in Kenya. *Zentralbl Veterinarmed B* **33**: 73–77
- NAGARAJAN G, SWAMİ SK, DAHİYA SS, SIVAKUMAR G, NARNAWARE SD, TUTEJA FC, PATIL NV (2013). Comparison of virokin from camel pseudocowpoxvirus (PCPV) with interleukin 10 of the Dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Cytokine.* **61**(2):356-359.
- NANDİ, S., DE, U.K. AND CHOWDHURY, S. (2011). Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep a global perspective. *Small Rumin. Res.*, **96**(2): 73-82.
- NASH, A.D.; BACA, M.; WRIGHT, C.; SCOTNEY, P.D. (2006) The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **19**, 61–69.
- Nİ, L.S.; ALLAUDİN, Z.N.B.; LİLA, M.A.B.M.; OTHMAN, A.M.B.; OTHMAN, F.B. (2013) Selective apoptosis induction in MCF-7 cell line by truncated minimal functional region of Apoptin. *BMC Cancer*, **13**, 488.
- NİTSCHKE A, BÜTTNER M, WILHELM S, PAULI G, MEYER H (2006). Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin Chem* **52**:316–319.
- NOLLENS HH, GULLAND FM, JACOBSON ER, HERNANDEZ JA, KLIEN PA, WALSH MT, CONDIT RC (2006). Parapoxviruses of seals and sea lions make up a distinct subclade within the genus Parapoxvirus. *Virology.* **349**(2):316-324.
- OEM JK, ROH IS, LEE KH, LEE KK, KİM HR, JEAN YH, LEE OS (2009). Phylogenetic analysis and characterization of Korean orf virus from dairy goats: case report. *Virol J.* **6**:167.
- OEM JK, CHUNG JY, KİM YJ, LEE KK, KİM SH, JUNG BY (2013). Isolation and characterization of orf viruses from Korean black goats. *J Vet Sci.* **14**:227–30.
- OGUZOGLU TC, ATALAY-VURAL S, KARAPINAR Z, ALKAN F (2009). Characterization and phylogenetic analysis of vaccine strain and Turkish field strain of ORF viruses. 3rd Annual Meeting EPIZONE “Crossing borders”, 12-15 May 2009, Antalya Turkey.
- OĞUZOĞLU TÇ, KOÇ BT, KİRDECI A, TAN MT (2014). Evidence of zoonotic pseudocowpox virus infection from a cattle in Turkey, *Virusdisease* **25**: 381–384.
- OLIVEIRA G, COSTA G, ASSIS F, FRANCO-LUIZ AP, TRINDADE G, KROON E, ABRAHÃO J, (2016). parapoxvirus. in molecular detection of animal viral pathogens. *crc press. iso* **690**, pp. 881-90.

- PARRISH S, MOSS B. (2007) Characterization of a second vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J Virol.* 2007 Dec; **81**(23):12973-8. doi: 10.1128/JVI.01668-07. Epub 2007 Sep 19. PMID: 17881455; PMCID: PMC2169080
- PRAVAS SAHU B, MAJEE P, SINGH RR, SAHOO N, NAYAK D (2022). Recombination drives the emergence of orf virus diversity: evidence from the first complete genome sequence of an Indian orf virus isolate and comparative genomic analysis. *Archives of Virology*, **167**:1571–1576.
- PERALTA A, ROBLES C, MARTÍNEZ A, ALVAREZ L, VALERA A, CALAMANTE G, KÖNIG GA. (2015). Identification and molecular characterization of Orf virus in Argentina. *Virus Genes*. **50**(3):381-8.
- PERALTA A, ROBLES CA, MICHELUD JF, ROSSANIGO CE, MARTÍNEZ A, CAROSIO A, KÖNIG GA (2018). Phylogenetic analysis of orf viruses from five contagious ecthyma outbreaks in Argentinian goats. *Front. Vet. Sci.* **5**(6):134.
- PETERSEN, B.W.; DAMON, I.K.; PERTOWSKI, C.A.; MEANEY-DELMAN, D.; GUARNIZO, J.T.; BEIGI, R.H.; EDWARDS, K.M.; FISHER, M.C.; FREY, S.E.; LYNFIELD, R. (2015) Clinical guidance for smallpox vaccine use in a post-event vaccination program. *MMWR Recomm. Rep.*, **64**, 1–26.
- PLOWRIGHT WR, FERRIS RD (1959). Papular stomatitis of cattle. II. Reproduction of the disease with culture-passaged virus. *Vet Rec* **71**: 828; cited in: M Binns, GL Smith (eds): *Recombinant poxviruses*. CRC Press, Boca Raton.
- REID HW (1991). Orf. In: WB Martin, ID Aitken (eds) *Diseases of sheep*. Blackwell, London, 265–269.
- ROBINSON AJ, LYTTLE DJ (1992). Parapoxviruses: their biology and potential as recombinant vaccines. In: M Binns, GL Smith (eds): *Recombinant poxviruses*. CRC Press, Boca Raton, 285–327.
- ROBINSON AJ, MERCER AA (1995). Parapoxvirus of red deer: evidence for its inclusion as a new member in the genus parapoxvirus. *Virology* 208: 812–815
- ROSLIAKOV AA (1972). Comparative ultrastructure of viruses of camel pox, poxlike disease of camels (AUZDUK) and contagious ecthyma of sheep. *Voprosi Virusol* **17**: 26–30.
- RZIHA HJ, BAUER B, ADAM KH, RÖTTGEN M, COTTONE R, HENKEL M, DEHIO C, BÜTTNER M (2003). Relatedness and heterogeneity at the near-terminal end of the genome of a parapoxvirus bovis 1 strain (B177) compared with parapoxvirus ovis (Orf virus). *J Gen Virol.* **84**(Pt 5):1111-1116.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCAGLIARINI A, CIULLI S, BATTILANI M, JACOBONI I, MONTESI F, CASADIO R, PROSPERI S. (2002) Characterisation of immunodominant protein encoded by the F1L gene of orf virus strains isolated in Italy. *Arch Virol.* **147**(10):1989-95. doi: 10.1007/s00705-002-0850-2. PMID: 12376759.

- SCAGLIARINI A, PIOVESANA S, TURRINI F, SAVINI F, SITHOLE F, MCCRINDLE CM. (2012). Orf in South Africa: endemic but neglected. *Onderstepoort J Vet Res.* **79**(1):E1-E8.
- SEET, B. T., MCCAUGHAN, C. A., HANDEL, T. M., MERCER, A., BRUNETTI, C., MCFADDEN, G., & FLEMING, S. B. (2003). Analysis of an orf virus chemokine-binding protein: Shifting ligand specificities among a family of poxvirus viroceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(25), 15137-15142.
- SEREEWIT JAYDEE, NICOLE A. P. LIEBERMAN, HONG XIE, SHAH A. K. MOHAMED BAKHASH, B. ETHAN NUNLEY, BENJAMIN CHUNG, MARGARET G. MILLS, PAVITRA ROYCHOUDHURY AND ALEXANDER L. GRENINGER (2022) ORF-Interrupting Mutations in Monkeypox Virus Genomes from Washington and Ohio
- SHANLEY JD (2015). Poxviruses: Background, Pathophysiology, Epidemiology. <http://emedicine.medscape.com/article/226239-overview>
- SMALL, S.; CRESSWELL, L.; LOVATT, F.; GUMMERY, E.; ONYANGO, J.; MCQUILKIN, C.; WAPENAAR, W. (2019) Do UK sheep farmers use orf vaccine correctly and could their vaccination strategy affect vaccine efficacy? *Vet. Rec.* **185**, 305.
- SMITH GL, SYMONS JA & ALCAMÍ A (1998). Poxviruses: Interfering with Interferon. *Seminars in Virology*, **8**(5), 409-418.
- STEEB (1787). Von der Schaf-Raude (Grind); cited in: H. Nürnberg: Über den ansteckenden Maulgrind der Schafe und Ziegen. Dr. med. vet. thesis, FriedrichWilhelms-Universität, Berlin.
- SPYROU V, VALIAKOS G. (2015). Orf virus infection in sheep or goats. *Vet Microbiol.* **14**;181(1-2):178-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.08.010. Epub 2015 Aug 12. PMID: 26315771.
- SULLIVAN, J.T., MERCER, A.A., FLEMING, S.B., ROBINSON, A.J. (1994). Identification and characterization of an orf virus homologue of the vaccinia virus gene encoding the major envelope antigen p37K. *Virology* **202** 968–973.
- ŞENTURK S, CATİK S, TEMİZEL EM, OZYİĞİT O (2016). Outbreak of bovine papular stomatitis with concurrent cryptosporidiosis in a dairy herd in Turkey, *BJVM* **19**: 78–83
- ŞEVİK M. (2017). Association of two clusters of Orf virus isolates in outbreaks of infection in goat in the Central Anatolian region of Turkey. *Virusdisease*. **28**(3):345-348.
- ŞEVİK M. (2019). Orf virus circulation in cattle in Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **65**:1-6.
- ŞEVİK M, DOĞAN M (2017). Epidemiological and molecular studies on lumpy skin disease outbreaks in Turkey during 2014–2015, *Transbound. Emerg. Dis.* **64**: 1268–1279.
- TEDLA M, BERHAN N, MOLLA W, TEMESGEN W AND ALEMU S (2018). Molecular identification and investigations of contagious ecthyma (orf virus) in small ruminants, North West Ethiopia. *BMC Vet. Res.*, **14**(1): 13.

- THOMAS K, TOMPKINS DM, SAINSBURY AW, WOOD A, DALZIEL R, NETTLETON PF, MCINNES CJ (2003). A novel poxvirus lethal to red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *J Gen Virol* **84**: 3337–3341.
- TIKKANEN MK, MCINNES CJ, MERCER AA, BUTTNER M, TUIMALA J, HIRVELA-KOSKI V, NEUVONEN E, HUOVILAINEN (2004). Recent isolates of parapoxvirus of Finnish reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) are closely related to bovine pseudocowpox virus. *J Gen Virol* **85**: 1413–1418.
- TİMURKAN MÖ, AYDIN H. (2019) Increased genetic diversity of BVDV strains circulating in Eastern Anatolia, Turkey: first detection of BVDV-3 in Turkey. *Trop Anim Health Prod.* **51** (7), 1953-61.
- TİMURKAN MÖ, KIRBAS A, AYDIN H, YANAR KE, AYDIN Ö (2021). First Molecular Characterization of Bovine Papular Stomatitis Virus and Meta-Analysis of Parapoxviruses in Turkey. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 76, 2: 55-62.
- TOPLU N, AYDOĞAN A, OGUZOĞLU TC (2007). Visceral leishmaniosis and parapoxvirus infection in a Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). *Journal of Comparative Pathology* **136**: 283-287.
- TORFASON EG, GUNADÓTTIR S. (2002). Polymerase chain reaction for laboratory diagnosis of orf virus infections. *J Clin Virol* **24**:79–84.
- TRYLAND M, JOSEFSEN TD, OKSANEN A, ASCHFALK A (2001). Parapoxvirus infection in Norwegian semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Vet Rec* **149**: 394–395.
- UMER, M.; JESSE, F.F.A.; SALEH, W.M.M.; CHUNG, E.L.T.; HARON, A.W.; SAHAREE, A.A.; LILA, M.A.M.; BİN ARİFF, A.; MOHAMMAD, K.; SHARİF, A. (2020) Histopathological changes of reproductive organs of goats immunized with *Corynebacterium pseudotuberculosis* killed vaccine. *Microb. Pathog.* **149**, 104539.
- UNDERWOOD, W.J.; BLAUWIEKEL, R.; DELANO, M.L.; GILLESBY, R.; MİSCHLER, S.A.; SCHOELL, A. (2015) Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). In *Laboratory Animal Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 623–694
- VELAZQUEZ-SALINAS L, RAMÍREZ-MEDINA E, BRACHT AJ, HOLE K, BRITO BP, GLADUE DP, CARRILLO C (2018). Phylodynamics of parapoxvirus genus in Mexico (2007-2011). *Infect Genet Evol.* **65**:12-14.
- VENKATESAN, G., DE, A., ARYA, S., KUMAR, A., MUTHUCHELVAN, D., DEBNATH, B.C., DUTTA, T.K., HEMADRI, D. AND PANDEY, A.B. (2018). Molecular evidence and phylogenetic analysis of orf virus isolates from outbreaks in Tripura state of North-East India. *Virus disease*, **29**(2): 216-220.
- WALLEY T (1890). Contagious dermatitis: “orf” in sheep. *J Comp Pathol Ther* **3**: 357–360.
- WASSIE, T., FANMEI, Z., JIANG, X. (2019). Recombinant B2L and Kisspeptin-54 DNA Vaccine Induces Immunity Against Orf Virus and Inhibits Spermatogenesis In Rats. *Sci Rep* **9**, 16262

- WEBER O, SIEGLING A, FRIEBE A, LÄMMER A, SCHLAPP T, KNOLLE P.ET AL. (2003) Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus and herpes simplex virus J Gen Virol **84**Pt 71843–1852.
- WEBER O, MERCER AA, FRIEBE A, KNOLLE P, VOLK HD. (2013) Therapeutic immunomodulation using a virus--the potential of inactivated orf virus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Apr;32(4):451-60. doi: 10.1007/s10096-012-1780-x.
- WILDY P (1971). Classification and nomenclature of viruses. First report of the International Committee on Nomenclature of Viruses. *Monogr Virol* **5**: 28; cited in [1].
- WILSON T, CHEVILLE N, KARSTAD L (1969). Seal pox. *Bull Wild Dis Assoc* **5**: 412418
- WILSON DJ, McFARLANE LES (2012) Contagious ecthyma in a rocky mountain bighorn sheep from Utah. *Hum. Wildl. Interact.* 6(2):7–11.
- WILSON TM, POGLAYEN-NEUWALL I (1971). Pox in South American sea lions (*Otaria byronia*). *Can J Comp Med* **35**: 174–177.
- WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2013). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 8th ed.* Paris, France: OIE.
- YAHAYA MAF, LILA MAM, ISMAIL S, ZAINOL M, AFIZAN N (2019). Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. *J. Immunol. Res.*1–9.
- YİRRELL DL, REID HW, NORVAL M, HOWIE SE (1989). Immune responses of lambs to experimental infection with orf virus, Vet Immunol immunopathol, **22**(4): 321-322
- YOGISHARADHYA R, KUMAR A, BHANUPRAKASH V, SHIVACHANDRA SB (2018). Evaluation of a recombinant major envelope protein (F1L) based indirect—ELISA for sero-diagnosis of orf in sheep and goats. *J. Virol. Methods*, **261**, 112–120.
- ZHANG K, XIAO Y, YU M, WANG Q, TAO P, LIU S, NING Z (2015). Phylogenetic analysis of three orf virus strains isolated different districts in Shandong Province, East China. *J Vet Med Sci*, **77**, (12): 1639-1645.
- ZHAO K, SONG D, HE W, LU H, ZHANG B, LI C, CHEN K, GAO F (2010). Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China. *Vet Microbiol.* **142**(3–4):408–415.
- ZAHOOR, M.A.; KHURSHID, M.; QURESHI, R.; NAZ, A.; SHAHID, M. (2016) Cell culture-based viral vaccines: Current status and future prospects. *Futur. Virol.* **11**, 549–562

EKLER

Ek-1a. Etik Kurul Kararı (Ön Sayfa)



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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 16/02/2022
TOPLANTI NO : 2022-4
DOSYA NO : 2022-28
KARAR NO : 2022-4-44

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tuba Çiğdem OĞUZÖĞLÜ'nün yaptığı; araştırmacı olarak Emre DURMUŞ'un katıldığı "Ruminant Parapox Virus Arşiv Materyallerinde ORFV011 (B2L), ORFV059 (F1L), ORFV020 (VIR), ORFV127 (vIL-10) Genlerinin Moleküler Tekniklerle Araştırılması" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın Etik Kurul iznine tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 16/02/2022-16/08/2023

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Ek-1b. Etik Kurul Kararı (Arka Sayfa)

Doç. Dr. Neşe Nuray TOPRAK (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K